

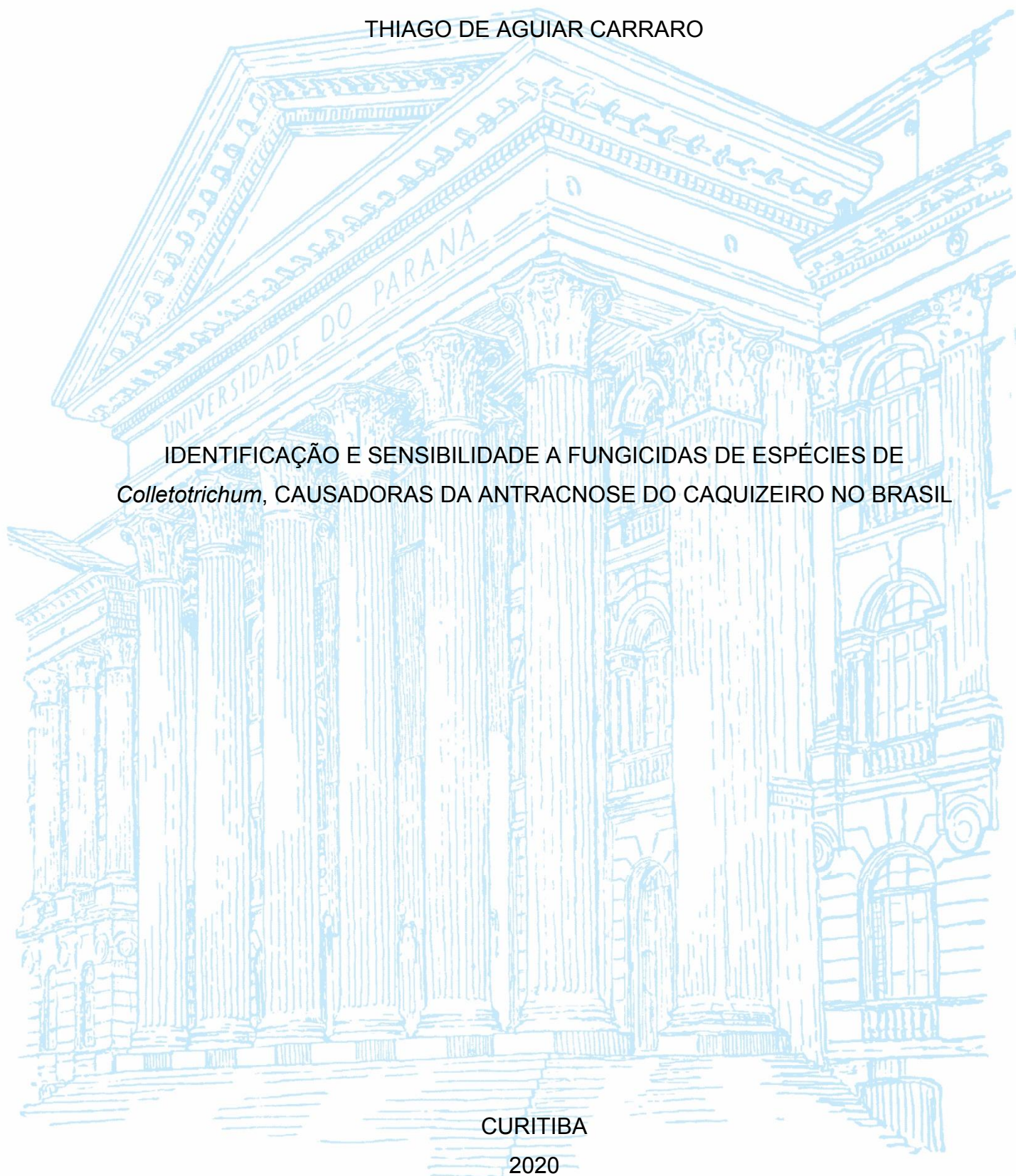
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO DE AGUIAR CARRARO

IDENTIFICAÇÃO E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ESPÉCIES DE
Colletotrichum, CAUSADORAS DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL

CURITIBA

2020



THIAGO DE AGUIAR CARRARO

IDENTIFICAÇÃO E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ESPÉCIES DE
Colletotrichum, CAUSADORAS DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Louise Larissa May De Mio

Coorientador: Dr. Paulo dos S. F. Lichtemberg

CURITIBA
2020

Carraro, Thiago de Aguiar

Identificação e sensibilidade a fungicidas de espécies de *Colletotrichum*, causadoras da antracnose do caquizeiro no Brasil. / Thiago de Aguiar Carraro - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal.

Orientadora: Louise Larissa May De Mio.

Coorientador: Paulo dos S. F. Lichtemberg.

1. Caqui - Doenças e pragas. 2. Infecções fúngicas - Etiologia. 3. Plantas - Efeito dos fungicidas. I. May De Mio, Louise Larissa. II. Lichtemberg, Paulo dos S. F. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu pai, ao meu irmão e à minha namorada, como forma de gratidão por todo o apoio e incentivo que me dão para que eu atinja os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Adriana de Aguiar; ao meu pai, José Carlos Carraro; e ao meu irmão, Gabriel de Aguiar Carraro, por serem fundamentais em todas as minhas conquistas e não medirem esforços para me ajudar. Estão sempre me apoiando para que eu alcance meus sonhos. Obrigado por todo o carinho e amor.

À minha namorada, Christiany Scarton, pessoa muito especial na minha vida, sempre ao meu lado, me fortalecendo e incentivando tanto o meu desenvolvimento pessoal quanto profissional. Sou muito grato por todo o amor, companheirismo e apoio que me dá.

À minha orientadora, professora Dr.^a Louise Larissa May De Mio, por toda a sua paixão pela ciência, entusiasmo, ensinamentos, curiosidades e experiências, que está sempre compartilhando e que inspiram o meu crescimento. Obrigado por todas as oportunidades que tem me dado e pela confiança em poder fazer parte do seu grupo.

Ao meu coorientador, Dr. Paulo dos S. F. Lichtemberg, pelo seu amor à pesquisa, que também me inspira e, mesmo distante (geograficamente), está sempre disponível para me ensinar, tirar dúvidas, conversar e orientar. Muito obrigado pela atenção; é e foi extremamente importante na minha formação. Agradeço também ao Dr. Themis J. Michailides, por me receber muito bem e por todo apoio que me deu no período em que fiz parte do seu grupo de pesquisa, e estendo os agradecimentos a toda a equipe do Kearney Agricultural Research and Extension Center – Universidade da Califórnia de Davis, por terem me acolhido muito bem.

À produtora Elizabethi – "Bethi", por sempre me receber muito bem e disponibilizar sua área para pesquisa.

Ao Dr. Marcos A. Dolinski, por me ensinar os primeiros caminhos da pesquisa e da fitopatologia; foi muito importante para o meu desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos do LEMID: Alexandre Claus, Camilla Castellar, Jhulia Gelain, Gabriel Koch, Heloisa Thomazi, Rafaele Moreira, Mônica Müller, Marlon Hahn, Juliana Maia, Fernando Albertin, Débora Peterman, Érica Zielinski, obrigado pela amizade e por compartilharem o dia a dia de trabalho comigo. Ao Dr. Wagner Vicente Pereira, por compartilhar seu conhecimento, sempre com discussões de alto nível, e por ter me auxiliado nas conduções de alguns experimentos. Ao professor Dr. Walmes Zeviani, por todo o suporte nas análises estatísticas dos experimentos.

Aos meus amigos: Artur Agustini Alves, Felipe Cappelletti, Filipe Augusto Pereira, Vitor Pangrácio, Renan Braulio, Pedro Henrique Busto Silva, Rodrigo Cavinatto, Stepan Rapachi, pelos momentos de descontrações, por toda amizade e apoio que sempre me deram.

Aos técnicos do laboratório, em especial, à técnica Marli Izabet Miranda Borges, que me ajudou em todos os ensaios. Além disso, obrigado pela compreensão e palavras de amizade, às vezes, mostrando o que fiz ou agi errado, bem como o que fiz certo; são ensinamentos valiosos, que vou levar sempre comigo.

À CAPES/CNPq, pelo auxílio da bolsa para realização deste trabalho.

*O impossível existe até que alguém
duvide dele e prove o contrário.*

(Albert Einsten)

RESUMO

Alta queda de produção do caquizeiro (*Diospyros kaki* Thunb.) vem sendo relatada na última década, no Brasil, principalmente, nas regiões produtoras Sul e Sudeste. Essa queda está associada, em parte, à ocorrência de antracnose. A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., provoca sérios danos e perdas na cultura, devido à queda prematura dos frutos. Além dos frutos, o patógeno pode infectar diferentes tecidos da planta. Nos últimos anos, foram realizados vários estudos nesse patossistema, porém a caracterização etiológica e o efeito dos fungicidas nesses patógenos ainda são incipientes no Brasil. Os objetivos deste trabalho foram: (i) descrever, em detalhes, a etiologia do agente causal da antracnose do caquizeiro no Brasil e (ii) investigar o nível de sensibilidade de *Colletotrichum* spp. a diferentes fungicidas para o caquizeiro, testando a eficiência de alguns produtos registrados para controle da antracnose. Em relação ao objetivo (i), as espécies identificadas de *Colletotrichum* foram caracterizadas com bases morfológicas, fisiológicas, patogênicas e moleculares; também foi investigada a patogenicidade cruzada (*ex vivo* – frutos e folhas e *in vivo* – ramos do ano) entre *Colletotrichum* spp. em frutos de caquizeiro, macieira e pereira. Para o objetivo (ii), ensaios *in vitro* foram realizados (determinação da CE₅₀ e estimativa do risco de ocorrência de sensibilidade cruzada); e (ii) ensaios *ex vivo* (teste de eficiência de fungicidas registrados para cultura, em frutos imaturos e maduros, sendo avaliadas duas espécies de *Colletotrichum*, que foram selecionadas com base nos resultados do objetivo (i). A antracnose do caquizeiro pode ser causada por espécies do complexo *C. gloeosporioides* - cCg (*C. horii* e *C. fructicola*) e do complexo *C. acutatum* - cCa (*C. nymphaeae* e *C. melonis*). As espécies do cCg foram predominantes nas quatro regiões produtoras avaliadas, sendo que, nos estados de São Paulo e Paraná, foram encontradas espécies dos dois complexos. Diferenças morfológicas foram relatadas entre as espécies. Os isolados do cCg revelaram temperaturas ideais de aproximadamente 25 a 26°C para crescimento micelial e germinação de conídios, enquanto para os isolados do cCa, as temperaturas entre 23 a 24°C foram ideais. Todas as espécies foram capazes de causar sintomas em todas as partes vegetais destacadas de caquizeiro, bem como nos ensaios de patogenicidade cruzada (*ex vivo* e *in vivo*), exceto o isolado de *C. horii*, que não causou doença em frutos de pera. A variabilidade de sensibilidade a fungicidas alterou entre isolados de diferentes espécies e mesorregiões avaliadas. Risco alto, médio e baixo de ocorrência de sensibilidade cruzada foram observados entre os fungicidas com mesmo modo de ação. A eficiência dos fungicidas testados foi comprovada, mas foram constatadas diferenças no controle da doença entre os ensaios de frutos imaturos e frutos maduros. Este é o primeiro estudo de caracterização de *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. melonis* em caquizeiro. Infecções cruzadas entre *Colletotrichum* spp. de caquizeiro, macieira e pereira podem ocorrer. Valores de CE₅₀ de ingredientes ativos não registrados podem servir como estudos de linha-base. Os fungicidas à base de difenoconazol e de mistura de IQe e IDM se mostraram eficazes para o controle da doença.

Palavras-chave: *Diospyros kaki* Thunb. Doença fúngica. Etiologia. Controle químico.

ABSTRACT

An extensive decline in persimmon production, has been related in the last decade in Brazil, mostly in South and Southeast producing areas. Such decline is associated, in part, to the occurrence of anthracnose. The anthracnose is caused by *Colletotrichum* spp. and leads to serious damages and losses to the crop, due to the premature drop of the fruits. Besides the fruits, the pathogen can infect different plant tissue. Studies regarding this pathosystem were performed in the last years, although some etiological gaps and of disease control need to be elucidated. The purposes of this study were: (i) to describe in details the etiology of the causal agent of persimmon anthracnose in Brazil; (ii) to research the fungicide sensitivity level of *Colletotrichum* spp. to different fungicides in persimmon, testing the efficacy of a few registered fungicide of anthracnose control. Regarding objective (i), the identified species of *Colletotrichum* were characterized with morphological, physiological, pathogenic, and molecular basis; it was also researched the cross-pathogenicity (*ex vivo* – fruit and leaves and *in vivo* – twigs) between *Colletotrichum* spp. in persimmon, apple, and pear. For objective (ii), *in vitro* assays were performed (establishment of EC₅₀ and risk estimation to the occurrence of cross-sensitivity); and (ii) *ex vivo* assays (efficacy tests of fungicides registered to the crop, in ripe and unripe fruits, evaluating two species of *Colletotrichum*, which were selected based on the results of objective (i)). The persimmon anthracnose can be caused by species of the complex *C. gloeosporioides* - cCg (*C. horii* e *C. fructicola*) e and complex *C. acutatum* - cCa (*C. nymphaeae* e *C. melonis*). The species of cCg were predominant in the four producing regions analyzed, and in the states of São Paulo and Paraná were verified species from both complexes. Morphological characteristics distinctions were observed between the species. The isolates of cCg revealed ideal temperate around 25-26°C for mycelial growth and conidia germination, whereas for the cCa isolates, the temperate between 23-24°C were ideal. All the species were able to cause the symptoms in the persimmon plant tissue detached, as well as in the crossed pathogenicity assays (*ex vivo* and *in vivo*), except the isolate of *C. horii*, which did not cause the disease in pear fruits. The variability of fungicide sensitivity was diverse between the isolates of different species and mesoregions studied. High, medium, and low risk of occurrence of crossed fungicide sensitivity was observed between fungicides with the same mode of action. The efficacy of the tested fungicide was attested, but it was also observed variation in the disease control between the assays of ripe and unripe fruits. This is the first study of characterization of *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. melonis* in persimmon. Cross-infection between *Colletotrichum* spp. of persimmon, apple and pear can occur. Values of EC₅₀ of non-registered active ingredients, can serve as baseline studies. The Fungicides with difenoconazole basis and the mix of Qol and DMI were proven efficient to control the disease.

Keywords: *Diospyros kaki* Thunb. Fungal Disease. Etiology. Chemical Control.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	QUANTIDADE PRODUZIDA (TONELADAS) DE CAQUIZEIRO NOS CINCO PRINCIPAIS ESTADOS PRODUTORES DO BRASIL, DURANTE UM PERÍODO DE DEZ ANOS (2009-2018)	25
FIGURA 2 -	SINTOMAS DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM TECIDOS DESTACADOS DA PLANTA DE CAQUIZEIRO.....	30
FIGURA 3 -	CICLO DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO, CAUSADA POR <i>Colletotrichum</i> spp., CARACTERIZADA POR MEIO DO LEVANTAMENTO DE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS NO BRASIL E NO MUNDO	35

FIGURAS DO CAPÍTULO I

FIGURA 1 -	MAPA DA OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp., AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) NO BRASIL, PROVENIENTES DOS ESTADOS DE SÃO PAULO (SP), PARANÁ (PR), SANTA CATARINA (SC) E RIO GRANDE DO SUL (RS).....	55
FIGURA 2 -	ISOLAMENTO DOS PATÓGENOS PROVENIENTES DE FLORES, RAMOS NOVOS E FRUTOS MADUROS	56
FIGURA 3 -	FREQUÊNCIA (%) DOS ISOLADOS POR COMPLEXO DE <i>Colletotrichum</i> EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE COLETA (n) DOS ISOLADOS POR ESTADO DE PRODUÇÃO NACIONAL, POR MEIO DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR PCR, UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS	73
FIGURA 4 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE 75 ISOLADOS DO COMPLEXO <i>C. acutatum</i> , INCLUINDO O <i>OUTGROUP</i> , CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA (IB), COM A CONCATENAÇÃO DA REGIÃO ITS-rDNA E DOS GENES PARCIAIS GAPDH E TUB2	75
FIGURA 5 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE 64 ISOLADOS DO COMPLEXO <i>C. gloeosporioides</i> , INCLUINDO O <i>OUTGROUP</i> ,	

	CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA (IB), COM A CONCATENAÇÃO DA REGIÃO ITS-rDNA E GENES PARCIAIS GAPDH E TUB2.....	80
FIGURA 6 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DOS ISOLADOS DE <i>C. horii</i>	85
FIGURA 7 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DOS ISOLADOS DE <i>C. fructicola</i>	86
FIGURA 8 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DOS ISOLADOS DE <i>C. nymphaeae</i>	87
FIGURA 9 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DO ISOLADO DE <i>C. melonis</i>	88
FIGURA 10 -	TAXA DE FORMAÇÃO DO APRESSÓRIO ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> DE CAQUIZEIRO.....	90
FIGURA 11 -	EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL (mm/dia) DE TREZE ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.	92
FIGURA 12 -	EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE TREZE ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.	93
FIGURA 13 -	SINTOMAS DE <i>Colletotrichum</i> EM FRUTOS DE CAQUIZEIRO (PRIMEIRA FILEIRA), MACIEIRA (SEGUNDA FILEIRA) E PEREIRA (TERCEIRA FILEIRA), APÓS 10 DIAS DE INOCULAÇÃO COM FERIMENTO.....	100
FIGURA 14 -	SINTOMAS DE <i>Colletotrichum</i> EM FOLHAS DE CAQUIZEIRO (PRIMEIRA FILEIRA), MACIEIRA (SEGUNDA FILEIRA) E PEREIRA (TERCEIRA FILEIRA), APÓS 12 DIAS DE INOCULAÇÃO SEM FERIMENTO.....	101
FIGURA 15 -	ESTIMATIVAS DE KAPLAN-MEIER PARA AS FUNÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA, COMPARANDO ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> APÓS 66 DIAS DA INOCULAÇÃO, EM RAMOS DO ANO, EM PLANTAS DE CAQUIZEIRO (<i>D. kaki</i>), LOCALIZADAS EM UM POMAR EXPERIMENTAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR), CURITIBA-PR, BRASIL	102

FIGURA 16 - SINTOMAS DE ANTRACNOSE CAUSADA POR ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> , EM RAMOS NOVOS DE PLANTAS DE CAQUIZEIRO 'FUYU'.....	103
--	-----

FIGURAS DO CAPÍTULO II

FIGURA 1 - MÉTODO DA DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL	125
FIGURA 2 DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) PARA AZOXISTROBINA (EM CINZA) E TRIFLOXISTROBINA (EM PRETO), ENTRE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp., CAUSADORES DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL.....	131
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) PARA DIFENOCONAZOL (EM CINZA) E TEBUCONAZOL (EM PRETO), ENTRE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp., CAUSADORES DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL.....	133
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) PARA DIFENOCONAZOL (EM CINZA) E TEBUCONAZOL (EM PRETO), ENTRE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp., CAUSADORES DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL.....	134
FIGURA 5 - ANÁLISE DA SENSIBILIDADE CRUZADA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. COLETADOS DE CAQUIZEIRO NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ	137
FIGURA 6 - SINTOMAS DE ANTRACNOSE CAUSADO POR <i>C. horii</i> E <i>C. fructicola</i> EM FRUTOS IMATUROS (FRUTOS VERDES) E MADUROS DE CAQUI 'FUYU', PROVENIENTES DO TESTE DE EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS.....	141

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRODUTOS COMERCIAIS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO CAQUIZEIRO NO BRASIL.....	42
--	----

TABELAS DO CAPÍTULO I

TABELA 1 - ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp., DA SAFRA 2017/18, UTILIZADOS NESSE TRABALHO, DEACORDO COM O CÓDIGO (LEMID), CULTIVAR, ORGÃO VEGETA, LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA (MESORREGIÃO, ESTADOS), SISTEMA DE PRODUÇÃO DE CULTIVO E CLASSIFICAÇÃO VISUAL POR GRUPOS DE COR DAS COLÔNIAS.....	58
TABELA 2 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NESTE ESTUDO, COM AS SEQUÊNCIAS E REFERÊNCIAS.....	61
TABELA 3 - ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>C. acutatum</i> UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK.....	76
TABELA 4 - ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>C. gloeosporioides</i> UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK.....	81
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS MORFOCULTURAIS DAS COLÔNIAS (COLORAÇÃO DO VERSO E REVERSO, TEXTURA DOS MICÉLIOS) E CONÍDIOS (FORMA, LARGURA, COMPRIMENTO E VOLUME) DOS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. DE CAQUIZEIRO.....	89
TABELA 6 - EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. DE CAQUIZEIRO, INCUBADOS A 5, 10, 15, 20, 25, 30, E 35°C, NO ESCURO, POR 7 DIAS OU 12	

HORAS, PARA O CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS, RESPECTIVAMENTE	91
TABELA 7 - PATOGENICIDADE DAS ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> EM FRUTOS DESTACADOS, INOCULADOS COM SUSPENSÃO DE ESPOROS (1×10^4 conídios mL ⁻¹), COM E SEM FERIMENTO	95
TABELA 8 - PATOGENICIDADE DAS ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> EM FRUTOS DESTACADOS, INOCULADOS COM DISCOS DE MICÉLIO (Ø 4 mm), COM E SEM FERIMENTO	96
TABELA 9 - PATOGENICIDADE E SEVERIDADE DAS ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> EM DIFERENTES TECIDOS DE CAQUIZEIRO, COM E SEM FERIMENTO	97
TABELA 10 - PATOGENICIDADE CRUZADA ENTRE AS ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> DE DIFERENTES HOSPEDEIROS, EM FRUTOS E FOLHAS DESTACADOS, COM FERIMENTO E SEM FERIMENTO, RESPECTIVAMENTE, DE CAQUIZEIRO (<i>D. kaki</i>), MACIEIRA (<i>M. domestica</i>) E PEREIRA (<i>P. communis</i>)...	99
TABELA 11 - NÚMERO DE RAMOS COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE (e) E TEMPO MEDIANO PARA EXPRESSÃO DOS SINTOMAS (pi) EM PLANTAS DE CAQUIZEIRO	102

TABELAS DO CAPÍTULO II

TABELA 1 - ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. DA SAFRA 2017/18, UTILIZADOS NESTE TRABALHO, DE ACORDO COM CÓDIGO (LEMID), ESPÉCIE, CULTIVAR, ÓRGÃO VEGETAL, LOCALIZAÇÃO (MESORREGIÃO, ESTADOS), SISTEMA DE CULTIVO	121
TABELA 2 - FUNGICIDAS UTILIZADOS NO ENSAIO DE SENSIBILIDADE PRÁTICA, EM FRUTOS IMATUROS E MADUROS DESTACADOS, SENDO DESCRITOS NOMES COMERCIAIS, INGREDIENTES ATIVOS, NOME DO GRUPO QUÍMICO (COM O CÓDIGO DE RESISTÊNCIA FRAC#), NOMES COMUNS E CIENTÍFICOS DAS DOENÇAS E PATÓGENOS E O	

PREPARO DA DILUIÇÃO DA CALDA FUNGICIDA (5L) PARA O ENSAIO.....	127
TABELA 3 - PADRÃO DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS INGREDIENTES ATIVOS AZOXISTROBINA E TEBUCONAZOL, E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS.....	129
TABELA 4 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO IQe's (FRAC#11), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL.....	131
TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO IDM's (FRAC#3), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL.....	132
TABELA 6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO ISDH's (FRAC#7), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL.....	134
TABELA 7 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO AP's (FRAC#9), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL.....	135
TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE ₅₀) DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS FUNGICIDAS CAPTAN (FRAC#M04) E CLOROTALONIL (FRAC#M05), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL.....	136
TABELA 9 - TESTE DE EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS (<i>ex vivo</i>) EM FRUTOS IMATUROS E MADUROS DE CAQUIZEIRO 'FUYU', COM FERIMENTO, COM INOCULAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> spp., AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE. FORAM ESTIMADOS O PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI), O PERÍODO DE LATÊNCIA (PL) E O DIÂMETRO DA LESÃO (mm).....	139

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CULTURA DO CAQUIZEIRO	21
2.1.1	Importância econômica	23
2.2	O GÊNERO <i>Colletotrichum</i>	25
2.2.1	Complexo de espécies de <i>Colletotrichum</i>	27
2.3	ASPECTOS GERAIS DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO	28
2.4	CICLO DA DOENÇA	30
2.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR	36
2.6	CONTROLE QUÍMICO PARA A ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO	41
2.6.1	Sensibilidade de <i>Colletotrichum</i> spp. a fungicidas.....	44
	CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i>, CAUSADORAS DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL	48
1	INTRODUÇÃO	51
2	METODOLOGIA	54
2.1	COLEÇÃO DE ISOLADOS.....	54
2.2	SELEÇÃO DOS ISOLADOS	57
2.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	58
2.3.1	Extração de DNA.....	58
2.3.2	Identificação por PCR.....	59
2.3.3	Identificação por sequenciamento	60
2.3.4	Análise filogenética.....	62
2.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	63
2.5	CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA (<i>in vitro</i>).....	64
2.5.1	Efeito da temperatura ótima no crescimento micelial	64
2.5.2	Efeito da temperatura ótima na germinação de conídios	65
2.5.3	Análise estatística.....	65
2.6	TESTES DE PATOGENICIDADE.....	67

2.6.1	Patogenicidade em órgãos vegetais destacados de caqui (<i>ex vivo</i>) ...	67
2.6.2	Patogenicidade cruzada (<i>ex vivo</i>).....	70
2.6.3	Patogenicidade comparativa de isolados obtidos de diferentes frutíferas, em ramos do ano (novos), em plantas de caquizeiro (<i>in vivo</i>).....	71
3	RESULTADOS	73
3.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	73
3.1.1	Identificação por PCR.....	73
3.1.2	Identificação por sequenciamento	73
3.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	84
3.2.1	<i>C. horii</i> (isolados PRDk 18-06, PRDk 18-08, PRDk 18-10, SPDk 18-01).....	84
3.2.2	<i>C. fructicola</i> (isolados SPDk 18-02, SPDk 18-04, SPDk 18-05, SPDk 18-06).....	85
3.2.3	<i>C. nymphaeae</i> (isolados PRDk 18-01, PRDk 18-02, PRDk 18-04, PRDk 18-07).....	87
3.2.4	<i>C. melonis</i> (isolado PRDk 18-11)	87
3.3	CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA (<i>in vitro</i>).....	90
3.4	TESTES DE PATOGENICIDADE.....	94
3.4.1	Patogenicidade em órgãos vegetais destacados de caqui (<i>ex vivo</i>) ...	94
3.4.2	Patogenicidade cruzada (<i>ex vivo</i>).....	97
3.4.3	Patogenicidade comparativa de isolados obtidos de diferentes frutíferas, em ramos do ano (novos), em plantas de caquizeiro (<i>in vivo</i>).....	101
4	DISCUSSÃO	104
5	CONCLUSÕES	113
	CAPÍTULO II - SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. DE FLORES E RAMOS DE CAQUIZEIRO, A DIFERENTES GRUPOS QUÍMICOS E EFICIÊNCIA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE	114
1	INTRODUÇÃO	117
2	METODOLOGIA	121
2.1	ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.....	121

2.2	SENSIBILIDADE DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS FUNGICIDAS (<i>IN VITRO</i>)	123
2.3	EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE, EM FRUTOS DE CAQUIZEIRO (<i>D. kaki</i> L.) DESTACADOS (<i>EX VIVO</i>)	126
2.3.1	Análises estatísticas	128
5	RESULTADOS	129
5.1	ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.	129
5.2	SENSIBILIDADE DE <i>Colletotrichum</i> spp. AOS FUNGICIDAS (<i>IN VITRO</i>)	129
5.2.1	Sensibilidade cruzada	136
5.3	EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE, EM FRUTOS DE CAQUIZEIRO (<i>D. kaki</i> L.) DESTACADOS (<i>EX VIVO</i>)	138
6	DISCUSSÃO	142
7	CONCLUSÕES	149
	REFERÊNCIAS	150
	APÊNDICE - TESTE DE IGUALDADE DA ANÁLISE DO EFEITO DE TEMPERATURA ÓTIMA	169

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o sexto maior produtor de caqui (*Diospyros kaki* Thunb.), tendo produção média de 156.935 toneladas, porém, quando analisado o rendimento do fruto, o país ocupa a primeira colocação, com 22.429 kg ha⁻¹ (FAO, 2018). No cenário nacional, as produções de caqui estão concentradas nas regiões Sul e Sudeste do país, sendo o estado de São Paulo (79.960 ton.) o principal produtor, seguido do Rio Grande do Sul (33.686 ton.), Rio de Janeiro (13.404 ton.), Minas Gerais (13.148 ton.) e Paraná (12.695 ton.) (IBGE, 2018). No entanto, na última década, observou-se queda drástica da produção, sendo, primeiramente, expressiva no estado do Paraná, com redução de aproximadamente 45% da produção, e, recentemente, no estado de São Paulo, no qual, nos últimos cinco anos, houve redução de 22% da produção (IBGE, 2018).

Essa queda da produção pode estar associada à ocorrência da antracnose, doença destrutiva, que vem afetando diversos pomares no Brasil e no mundo. A doença se agrava em pomares com deficiência nutricional, podendo afetar o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo e aumentar a suscetibilidade a doenças. Além disso, pomares com práticas culturais inadequadas (falta de poda, tratamento de inverno na época incorreta, falta de remoção das partes vegetais infectadas) e outras doenças, como cercosporiose, também podem ser fatores associados à queda das produções de caqui observada no Brasil.

A antracnose é causada por espécies do gênero *Colletotrichum* e pode afetar diversas culturas, principalmente, as frutíferas, causando doença tanto em pré-colheita quanto em pós-colheita (HYDE et al., 2009; PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012; DOWLING et al., 2020). Para o caquizeiro, essa é a principal doença, pois o patógeno pode infectar diversos tecidos da planta, como as flores, os ramos, as folhas, os frutos imaturos e maduros, provocando danos severos, como quedas prematuras dos frutos e, conseqüentemente, impacto nas produções (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; DOLINSKI et al., 2016). Na China, houve relatos de reduções de até 90% da produção, mesmo em áreas com aplicações de produtos fitossanitários (DENG et al., 2019).

Os sintomas da doença são geralmente de aspectos enegrecidos, deprimidos, necróticos, de formato oval a circular, podendo variar o diâmetro da lesão e, muitas

vezes, estão acompanhados de mucilagem alaranjada de conídios nos centros das lesões (XIE et al., 2010; KWON et al., 2013; BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015). O patógeno pode sobreviver nos ramos de uma safra a outra, sendo os ramos de ano (velhos) importantes fontes de inóculo primário para as epidemias poliéticas, nos pomares de caquizeiro (DOLINSKI; GORAYEB; MAY DE MIO, 2015).

O agente causal foi primeiramente descrito como *Gloeosporium kaki* por Shotari Hori (1910) e Seiya Ito (1911). Posteriormente, Weir e Johnston (2010) identificaram o agente causal como *C. horii* e, diante da recente reclassificação filogenética, essa espécie foi separada dentro do complexo *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Até recentemente, essa era a única espécie relatada como agente causal da antracnose do caquizeiro no mundo (MAY DE MIO et al., 2015; DENG et al., 2019). Porém, têm sido reportados novos agentes causais dessa doença, como as espécies *C. acutatum* nos EUA (WILLIAMSON; SUTTON, 2010); *C. karstii* na China (WANG et al., 2016); *C. siamense* e *C. nymphaeae* na Coreia do Sul (HASSAN et al., 2018; HASSAN; LEE; CHANG, 2019). No Brasil, desde 2007, pesquisadores do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID), da Universidade Federal do Paraná, têm desenvolvido trabalhos para compreender esse patossistema (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; MAY DE MIO et al., 2015; DOLINSKI; GORAYEB; MAY DE MIO, 2015; DOLINSKI et al., 2016). Entretanto, com os novos relatos de espécies causadoras da antracnose do caquizeiro no Brasil (CARRARO et al., 2019), ainda são necessários estudos etiológicos com maior número de isolados para sua identificação e correta adoção de estratégias de controle da doença.

Vários estudos vêm demonstrando a variabilidade genética que pode existir entre as espécies de *Colletotrichum*, como: mudanças nos padrões fenotípicos, diferentes ciclos de vida para cada organismo (PERES et al., 2005; DE SILVA et al., 2017), taxonomia (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012), biologia (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004) e diferenças na sensibilidade do fungo aos fungicidas, ou seja, cada indivíduo pode expressar um comportamento e, dessa forma, ter diferentes mecanismos para atacar o hospedeiro (DOWLING et al., 2020). As identificações dos patógenos eram tradicionalmente realizadas apenas com base nos critérios morfológicos, como: coloração de colônias, formato de conídios e

apressórios, produção de peritécio (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998), taxa de crescimento micelial em meio BDA (SUTTON, 1992), bem como sensibilidade ao fungicida benomil (VALERO et al., 2010). Essas características fenotípicas podem variar em diferentes condições ambientais, as quais, muitas vezes, não são adequadas para distinguir espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009). Atualmente, as identificações de espécies têm utilizado uma abordagem polifásica, a qual agrupa as análises filogenéticas *multilocus* com caracterizações morfológicas e fisiológicas, testes de patogenicidades, análises das produções de metabólitos e/ou estudos ecológicos (PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012; LIU et al. 2016).

Para controlar essa doença, a utilização de produtos químicos é um dos métodos mais eficazes. No Brasil, poucos produtos estão registrados para essa cultura e, dentre esses produtos, apenas os inorgânicos à base de cobre estão indicados para a antracnose (AGROFIT, 2020). Os produtos, em sua maioria, são compostos basicamente por dois grupos químicos: os Inibidores da DesMetilação (IDM) e os Inibidores da Quinona externa (IQe), que apresentam risco médio e alto para seleção do fungo à resistência, respectivamente (FRAC, 2020). No mundo, poucos trabalhos de sensibilidade de *Colletotrichum* spp. aos fungicidas para o caquizeiro foram realizados (LIM; CHOI, 2006; LIM et al., 2009; GANG et al., 2015; YU et al., 2019), enquanto, no Brasil, não há estudos que forneçam essas informações para os produtores.

A restrita quantidade de produtos registrados, bem como o fato de a maioria serem de sítios-específicos, com mesmo modo de ação, são preocupantes, pois esses fungicidas podem resultar na perda da eficiência em campo, se não forem adequadamente manejados. Por essa razão, estudos para a compreensão dos níveis de sensibilidade do fungo aos fungicidas, tais quais os ensaios de eficiência de controle dos produtos, são necessários para a adoção de estratégias de controles eficientes ao longo das safras.

Diante desse contexto, este trabalho visa em linhas gerais: (i) descrever a etiologia do agente causal da antracnose do caquizeiro no Brasil e (ii) investigar o nível de sensibilidade de *Colletotrichum* spp. da cultura caquizeiro para diferentes fungicidas para o caquizeiro, testando a eficiência de alguns produtos registrados como potenciais a serem utilizados no controle da antracnose. O trabalho está subdividido em dois capítulos, onde serão detalhados os objetivos gerais, descritos acima: Capítulo I - Caracterização morfofisiológica, patogênica e molecular de

espécies de *Colletotrichum*, causadoras da antracnose do caquizeiro no Brasil; e Capítulo II - Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* spp., de flores e ramos de caquizeiro, a diferentes grupos químicos e eficiência no controle da antracnose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO CAQUIZEIRO

O caquizeiro (*Diospyros kaki* Thunb.) produz um fruto que é muito apreciado pelas suas características sensoriais, nutricionais, que servem como fontes energéticas de fibras, vitaminas e compostos fenólicos, o que torna a fruta potencial para aplicações em diversos segmentos da indústria (PIO, 2003). Essas características resumem o significado da palavra *Diospyros*, que, em grego, significa "alimento dos deuses". O caquizeiro é pertencente à família Ebenaceae, de hábito caducifólio, arbórea, rústica e de alta capacidade de adaptação. Tem como centro de origem primário as montanhas centrais da China e secundário o Japão, onde é cultivado há milhares de anos. Posteriormente, a cultura foi difundida para outras regiões de cultivo e está presente em quase todas as localidades de clima temperado e subtropical do mundo. Foi introduzido no Brasil, por volta de 1890, em São Paulo, porém a difusão do seu cultivo se deu a partir de 1920, com a chegada dos imigrantes japoneses, que trouxeram novas cultivares e conhecimentos sobre o seu cultivo (PENTEADO, 1986).

O caquizeiro tem boa adaptação a diversas variações climáticas, porém necessita de horas de frio no período de repouso, sendo importante para a quebra da dormência das gemas e para a ocorrência de brotação com florescimento abundante e uniforme (BIASI, 2017). Fato esse que o tornou um produto de importante exploração comercial devido se aclimatar muito bem nas regiões de clima temperado e subtropical (MARTINS; PEREIRA, 1989). O caquizeiro é produzido, tradicionalmente, nas regiões Sudeste e Sul do país e o período de colheita varia de fevereiro a junho. No entanto, pesquisas vêm se intensificando no semiárido brasileiro, mais precisamente, no Vale do São Francisco, em Petrolina-PE e Juazeiro-BA. As perspectivas com a cultura no Vale do São Francisco estão sendo

positivas, pois as plantas têm demonstrado boa produtividade, baixa ocorrência de pragas e doenças, além de possibilitarem um sistema de manejo capaz de produzir frutos em todos os meses do ano. Isso é uma grande vantagem, pois, encerrada a safra nacional, a fruta é importada da Espanha e Israel, chegando ao consumidor a partir do mês de outubro e comercializada com preços até cinco vezes maiores do que os estimados com a fruta nacional (LOPES et al., 2014).

A fruta é tipo baga, com grande variabilidade de formas e tamanhos, dependendo da cultivar. A cor passa de verde-oliva a amarelo-laranja e, quando atinge a maturação fisiológica, apresenta cor vermelha intensa (MARTINS; PEREIRA, 1989; RAGAZZINI, 1985). Os compostos bioativos antioxidantes e as fibras dos frutos são utilizados por indústrias farmacêuticas, nutricionais e cosméticas (MATHEUS et al., 2020).

O caquizeiro pode apresentar etapas de abscisão fisiológica dos frutos, sendo esse período variável para cada cultivar, mas, geralmente, ocorre nos primeiros meses de frutificação, devido ao esgotamento máximo das reservas de amido, provocado pelo crescimento da parte aérea (YAMAMURA; NAITO; MOCHIDA, 1976). Para algumas cultivares, essa queda fisiológica pode ocorrer até 98 dias após o florescimento e pode afetar de 25 a 45% da carga de frutos (GIN RAZZOUK, 2007).

As cultivares de caquizeiro brasileiras são classificadas como Shibugaki, Amagaki e caquis variáveis. O grupo Shibugaki ou caquis moles apresentam polpa com coloração amarelada e são taninosos. Para a maioria das cultivares, no momento da colheita, o conteúdo de taninos no fruto ainda é muito alto, causando sabor adstringente, o que, em algumas cultivares, desaparece ao atingir a maturação fisiológica ou por meio de tratamento específico de destanização (MARTINS; PEREIRA, 1989). As cultivares Kakimel, Taubaté, Mikado e Pomelo são as principais representantes desse grupo. No grupo Amagaki ou caquis duros, os frutos também apresentam coloração amarelada, entretanto são sempre doces, sem adstringência. Nesse grupo, estão as cultivares Fuyu, Fuyuhana e Jiro. Já os caquis variáveis subdividem-se em dois grupos: os de polpa escura (caqui café ou chocolate), com semente e não adstringente; e os frutos com polpa amarela, sem sementes e taninosos, por exemplo: as cultivares Rama-Forte, Giombo e Kyoto (MATOS, 1999).

As cultivares mais plantadas de caqui no Brasil variam entre as regiões, por exemplo: na região Sudeste, prevalecem as cultivares Rama forte, Fuyu, Guiombo e

Taubaté; e, na região Sul, as cultivares Fuyu e Kyoto (AGUIAR et al., 2014). Destas, a cultivar Fuyu é a mais cultivada, devido, principalmente, às suas características nutricionais e por produzirem frutos grandes, sem sementes e sem tanino, permitindo ao produtor atingir melhores valores de comercializações, tanto para o mercado interno quanto para o externo (BRACKMANN; MAZARO; SAQUET, 1997).

Apesar da rusticidade aparente da planta de caquizeiro, é uma planta suscetível a ataques de diversos patógenos, como: i) *Colletotrichum* spp. – antracnose; ii) *Pseudocercospora kaki* – cercosporiose ou mancha angular das folhas; iii) *Botrytis cinerea* – mofo cinzento; iv) *Pestalotiopsis* spp. – cancro em ramos e mancha foliar; v) *Ceratobasidium* spp. – mal-do-fio ou queima-do-fio; vi) Mancha de fuligem (MF) e sujeira da mosca (SM) são causadas por um complexo de fungos, e a espécie da mosca relatada na literatura é *Schyzothyrium pomi*. A importância dessas doenças vai variar de região e entre as condições das safras. Entretanto, a antracnose e a cercosporiose são as doenças mais importantes por causarem maiores danos à cultura. A mancha foliar e o cancro causado por *Pestalotiopsis diospyri* (ALVES et al., 2011) têm sido frequentemente observados nos campos de produções, nos últimos anos e, eventualmente, podem se tornar as principais doenças do caquizeiro.

2.1.1 Importância econômica

O Brasil é o sexto maior produtor (156.935 ton.) mundial de caqui, atrás da China (3.084.458 ton.), Espanha (492.320 ton.), República da Coreia (346.679 ton.), Japão (208.000 ton.) e Azerbaijão (160.092 ton.). Entretanto, o Brasil é o país que apresenta maior rendimento de fruto (22.429 Kg ha⁻¹), superando a China, cujo rendimento é de 4.256 Kg ha⁻¹ (FAO, 2018). A produção nacional está concentrada nas regiões Sul (49.311 ton.) e Sudeste (107.340 ton.), com 3.632 ha e 4.486 ha de áreas plantadas, respectivamente, sendo o estado de São Paulo o principal produtor nacional, com 79.960 ton., seguido dos estados do Rio Grande do Sul (33.686 ton.), Rio de Janeiro (13.404 ton.), Minas Gerais (13.148 ton.), Paraná (12.695 ton.) e Santa Catarina (2.930 ton.) (IBGE, 2018); (FIGURA 1).

Entre 2009 e 2018, tem se observado redução na produção de caqui no país. Queda expressiva foi notada primeiramente no estado do Paraná. Em 2010, o

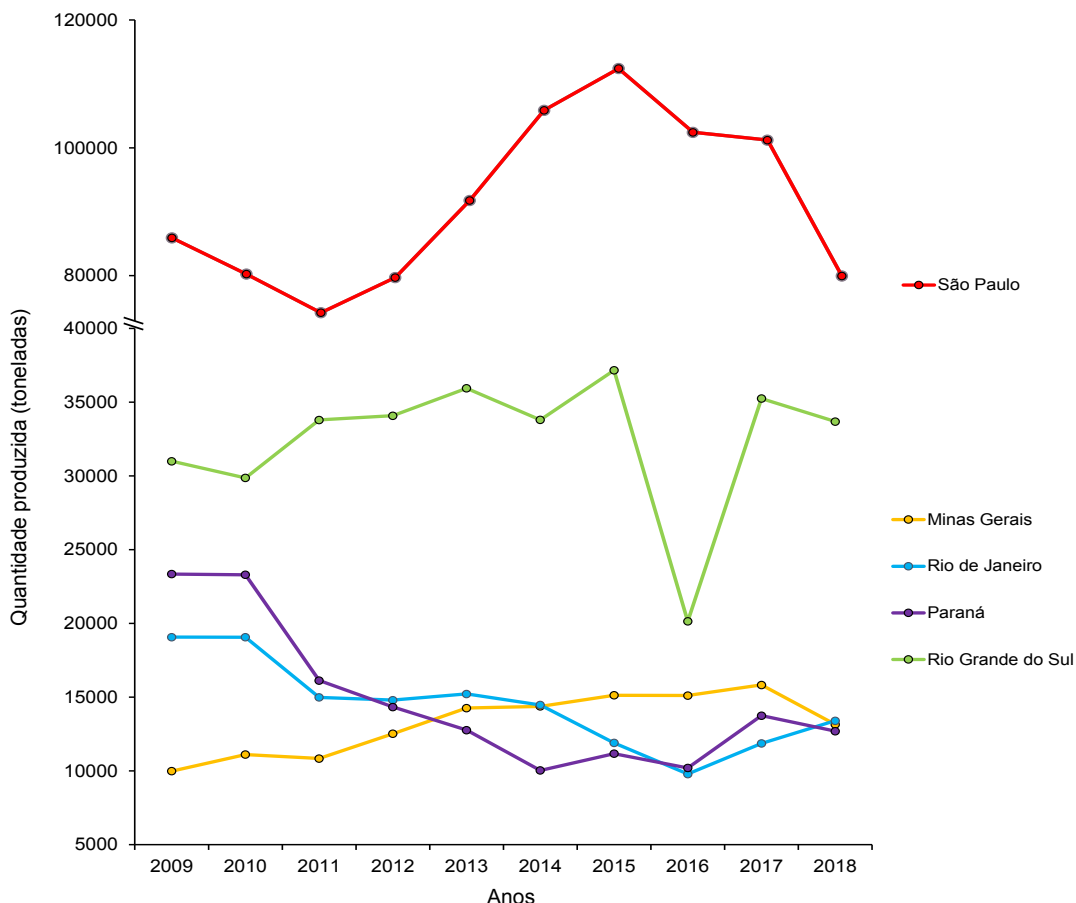
Paraná configurava-se como terceiro maior produtor do país e, com a redução de aproximadamente 45,63% da produção até 2018, passou a ser o sexto maior produtor. A queda de produção do estado do Paraná está associada, em parte, à antracnose, que se agravou após forte geada em Campina Grande do Sul, no ano de 2006 (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015).

Devido à rusticidade das plantas de caquizeiro, muitos produtores não realizavam o manejo cultural, nutricional e, principalmente, fitossanitário adequado para a cultura. A alta incidência de antracnose, tanto em pomares comerciais orgânicos quanto em convencionais, foi se intensificando ao longo do tempo e vem causando sérios prejuízos socioeconômicos ao município de Campina Grande do Sul (MAY DE MIO et al., 2015). Como exemplo desse impacto socioeconômico, desde 1977, o município de Campina Grande do Sul realizava a tradicional festa do caqui, conhecida como Kakifest, a qual proporcionava comercialização e divulgação dos produtos (*in natura* ou processados). Era uma importante oportunidade econômica para pequenos e médios produtores da região metropolitana de Curitiba e, conseqüentemente, para o município, pois recebiam alto número de pessoas (Informação pessoal). O fato de estar em posição geográfica privilegiada para o mercado, localizada às margens da rodovia Régis Bittencourt (BR-116), facilitava os canais de comercialização, trazendo grandes oportunidades de negócios. Entretanto, com a redução da produção de caqui, o evento deixou de existir a partir de 2011. Além disso, muitos produtores erradicaram os pomares, devido à dificuldade de controle da antracnose (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015).

O estado de São Paulo também vem sofrendo redução da produção (FIGURA 1). Desde 2015, fiscais da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) começaram a observar elevado número de frutos para comercialização com sintomas de antracnose e, em conjunto com demandas de produtores que relatavam a alta incidência da doença no campo, iniciaram um movimento – com suporte técnico dos pesquisadores do Instituto Biológico de Campinas – com o intuito de evitar a disseminação do *Colletotrichum* no estado e delinear estratégias para o controle da doença (Informação pessoal). Porém, o que se tem observado é uma queda contínua da produção, chegando a 28,9% segundo o último censo de dados coletado (FIGURA 1). E, diante desse cenário, essa queda da produção pode também estar associada, em parte, à antracnose, que, até então,

era considerada como doença secundária para o estado, pois sofriam mais com os impactos de cercosporiose, causada por *Pseudocercospora kaki* (ALVES, 2019).

FIGURA 1 - QUANTIDADE PRODUZIDA (TONELADAS) DE CAQUI NOS CINCO PRINCIPAIS ESTADOS PRODUTORES DO BRASIL, DURANTE UM PERÍODO DE DEZ ANOS (2009-2018)



FONTE: O autor, adaptado do IBGE (2018).

2.2 O GÊNERO *Colletotrichum*

As espécies do gênero *Colletotrichum* são conhecidas por infectarem diversas culturas cultivadas, de importância econômica, causando severos danos para essas culturas e, conseqüentemente, resultando em significativas perdas (SUTTON, 1992; HYDE et al., 2009; CANNON et al., 2012). Esses patógenos podem causar doenças tanto em pré-colheita quanto em pós-colheita, sendo muito comum a ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (CAI et al., 2009). Esse gênero foi inserido entre os 10 grupos de patógenos de plantas mais estudados e de maior importância científica e econômica no mundo (DEAN et al., 2012). A complexidade desse gênero é tão

relevante que os patógenos podem apresentar diferentes ciclos de vida, como organismos saprofíticos, endofíticos (GAUTAM, 2014; ARAÚJO et al., 2018) e até patogênicos aos humanos (CANO et al., 2004; SHIVAPRAKASH et al., 2011). Contudo, ainda se tem muita falta de consenso quanto à etiologia, devido às constantes mudanças das caracterizações morfológicas, fisiológicas e patogênicas dessas espécies em relação aos hospedeiros (CANNON et al., 2012).

Inicialmente, o nome *Colletotrichum* (Teleomorfo: *Glomerella*) foi introduzido por Corda (1831), como *C. lineola*, considerada, há muito tempo, como espécie sinônima de *C. dematium*, mas, com as recentes reclassificações filogenéticas, foi classificada como espécie independente (DAMM et al., 2009). As classificações começaram a se diferenciar a partir de Von Arx (1957), o qual, com apenas a distinção de características morfológicas e pequenas características de patogenicidade, reduziu de 750 espécies que eram relatadas de *Colletotrichum* para 11 espécies. Em seguida, Simmonds (1965) separou a espécie *C. acutatum* da espécie *C. gloeosporioides* por meio da morfologia dos conídios, na qual foram observadas diferenças no comprimento dos conídios e características de formatos mais fusiformes para os isolados de *C. acutatum* quando comparados com *C. gloeosporioides*. Após isso, as espécies de *Colletotrichum* foram caracterizadas quanto à forma e ao tamanho de conídios e apressórios, produção ou não de peritécio, presença ou ausência de setas, acérvulo, morfologia de colônias (cor e textura), crescimento das colônias em meio BDA e sensibilidade do fungo ao fungicida benomil (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; CANNON et al., 2000; SUTTON, 1992; VALERO et al., 2010).

Após uma reunião internacional, realizada nos anos 90, de especialistas que trabalhavam com o gênero *Colletotrichum*, foram reveladas novas ideias que causaram certo impacto na comunidade científica que estudava esse gênero (CANNON et al., 2012). A ideia foi a de estabelecer a identificação das espécies com base nos caracteres genéticos, com o suporte das ferramentas moleculares. As análises moleculares para identificação das espécies desse gênero foram revistas e considera-se, atualmente, a identificação molecular baseada em abordagem polifásica, com análise filogenética, baseada em diversos genes (*multilocus*). Em conjunto com os caracteres morfológicos, fisiológicos e patogênicos, tem sido adequada para caracterização das espécies de *Colletotrichum* por possibilitarem o

reconhecimento de clados estáveis e bem desenvolvidos desse gênero (CAI et al., 2009; PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012).

A análise molecular permite melhor confiabilidade para identificação das espécies e tem revelado resultados importantes. Com a análise molecular, é possível construir árvores filogenéticas de organismos com representantes de várias áreas geográficas, podendo criar comparação com indivíduos de isolados de mesmo hospedeiro, mas, em regiões distintas; ou até as mesmas espécies que infectam diferentes hospedeiros e se pode haver relação entre elas. É possível investigar até a evolução de espécies que interagem entre si, como relação de hospedeiros, parasitas ou simbioses, coevolução de fungos e plantas, permitindo desenvolver diferentes análises. No geral, é importante para se compreender a evolução dos caracteres entre si, bem como a dinâmica de populações (SCHNEIDER, 2007).

2.2.1 Complexo de espécies de *Colletotrichum*

Ao todo, já foram reclassificadas as espécies em 14 complexos de *Colletotrichum* (MARIN-FELIX et al., 2017; DAMM et al., 2019). Dentre esses, as espécies do complexo *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo e *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds são historicamente mais importantes, principalmente, para as frutíferas de clima subtropical e tropical (CANNON et al., 2012; DEAN et al., 2012). Espécies desses complexos foram recentemente reportadas como agentes causais da antracnose do caqui no Brasil (CARRARO et al., 2019). No Brasil, espécies desses mesmos complexos também estão infectando a cultura da macieira, causando dois tipos de doenças: mancha foliar de *Glomerella* e podridão amarga (MOREIRA et al., 2019a). Esses complexos também foram relatados em citros (TIMMER et al., 1994; SILVA et al., 2017), causando PFC (Podridão Floral do Citros), e em videira (GUGINSKI-PIVA et al., 2018).

As espécies desses complexos foram caracterizadas e reclassificadas, inicialmente, por Damm et al. (2012), para o complexo *C. acutatum*, e por Weir, Johnston e Damm (2012), para o complexo *C. gloeosporioides*. Para o complexo *C. acutatum*, têm-se relatado 34 espécies (DAMM et al., 2012; HUANG et al., 2013; BRAGANÇA et al., 2016; JAYAWARDENA et al., 2016; DE SILVA et al., 2017),

enquanto, para o complexo *C. gloeosporioides*, têm-se 22 espécies relatadas (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

As diferenças existentes entre os complexos de *Colletotrichum* são mais detalhadas e conhecidas, porém diferenças entre espécies pertencentes ao mesmo complexo e consideradas agentes causais de doença no mesmo hospedeiro ainda precisam ser bem esclarecidas e diferenciadas para que haja estratégias adequadas de controle das doenças. Em recente revisão publicada, os autores propõem algumas estratégias de controle de doenças causadas por *Colletotrichum* que afetam as frutíferas nos EUA. Foram levantados alguns pontos importantes para serem analisados no contexto geral da epidemia em hospedeiros que são infectados pelos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Por exemplo, os autores relataram que as espécies podem apresentar diferenças entre os complexos, mas também entre as espécies pertencentes ao mesmo complexo, podendo expressar diferentes respostas à especificidade do tecido da planta, agressividade, intensidade da doença, frequência/distribuição desses patógenos e sensibilidade a fungicidas, sendo alguns fatores importantes, que devem ser considerados para uma proposta eficaz de manejo de controle (DOWLING et al., 2020).

2.3 ASPECTOS GERAIS DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO

O agente causal da antracnose do caquizeiro foi reportado como *Gloeosporium kaki* por Shotaro Hori (1910) e Seiya Ito (1911). Maffei (1921) reportou a espécie *C. kaki* como patógeno de mancha foliar em caquizeiro. Posteriormente, Von Arx, por meio das caracterizações morfológicas, descreveu que os patógenos relatados anteriormente se tratavam de *C. gloeosporioides*. Weir e Johnston (2010) caracterizaram isolados provenientes da China, Japão e Nova Zelândia, com base nos caracteres morfológicos e moleculares, e renomearam o agente causal da antracnose do caquizeiro como *C. horii*. Desde a nova reclassificação filogenética, essa espécie faz parte do complexo *C. gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

A espécie *C. horii* é o principal agente causal da antracnose do caquizeiro (WEIR; JOHNSTON, 2010; XIE et al., 2010; MAY DE MIO et al., 2015), porém já se tem relatos de outras espécies como causadoras dessa doença. No mundo, foram

relatadas as espécies *C. gloeosporioides* (KWON; KIM, 2011; PALOU et al., 2015), *C. acutatum* (WILLIAMSON; SUTTON, 2010), *C. karstii* (WANG et al., 2016), *C. siamense* (HASSAN et al., 2018) e *C. nymphaeae* (HASSAN; LEE; CHANG, 2019). No Brasil, além de *C. horii*, há relato de que *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. melonis* também causam a antracnose do caquizeiro (CARRARO et al., 2019).

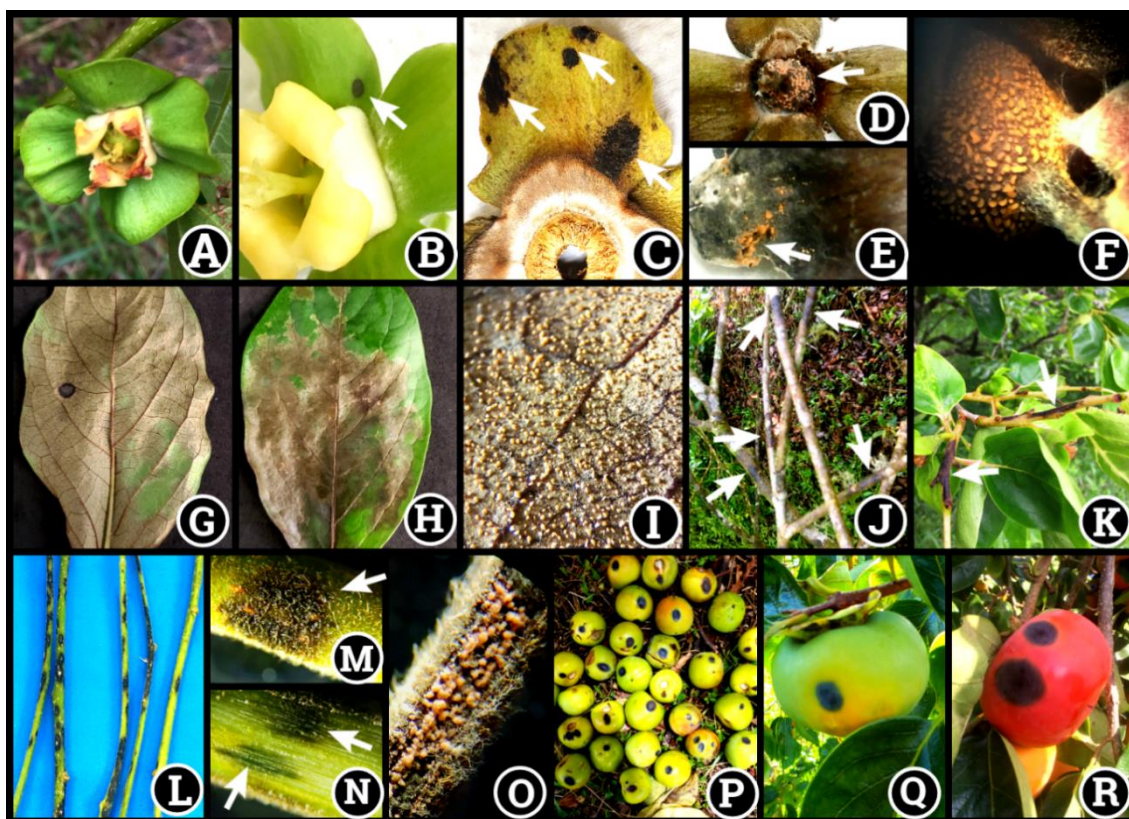
Os sintomas da antracnose podem ser observados em flores, ramos do ano (novos) e ramos de ano (velhos), folha e frutos. A incidência da doença em flores foi, inicialmente, relatada por Blood, Rozwalka e May De Mio (2015), que observaram sintomas necróticos mais frequentes nas sépalas. Outras evidências apontam que a doença pode afetar todas as partes florais. Deng et al. (2019) também observaram os sintomas da doença no cálice (sépalas) com frutos formados (FIGURA 2 A-F).

Em ramos mais velhos, nota-se lesões escuras, alongadas e secas, com fissuras longitudinais, que se desenvolvem ao longo do tempo (FIGURA 2 J), porém, muitas vezes, são confundidos com outros agentes causais, que também causam cancrios em ramos no caquizeiro, como o patógeno *Pestalotiopsis diospyri* (ALVES et al., 2011). Os sintomas característicos nos ramos novos são de lesões ovais, necróticas e deprimidas, que, muitas vezes, são encontradas em grandes números, em um único ramo (FIGURA 2 K-O). Essas lesões em ramos podem permanecer latentes em condições adversas (inverno), porém o fungo continua infectando e se estende pelo xilema, resultando em colapsos longitudinais, com a formação dos cancrios (XIE et al., 2010; MAY DE MIO et al., 2015). Nas folhas, observa-se lesões necróticas, iniciando pelo pecíolo, que se estendem para as nervuras. Em casos com alta incidência da doença, essas lesões se espalham e é possível identificar tanto na face adaxial (FIGURA 2 H), quanto na face abaxial (FIGURA 2 G), podendo a lesão coalescer e causar o secamento das folhas (XIE et al., 2010; BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; DENG et al., 2019).

Os sintomas em frutos podem ser observados tanto em fase imatura (FIGURA 2 Q), quanto em fase madura (FIGURA 2 R). As lesões iniciais observadas são de pequenas manchas escuras, de coloração pardo-escuro a preto, deprimidas, necróticas, de formato oval a elíptica, que podem se desenvolver e atingir áreas maiores da polpa do fruto, provocando a queda ou podridão na colheita ou em pós-colheita (FIGURA 2 P). Em condições favoráveis de alta umidade e temperatura, próximas a 25°C, são observadas, nos centros das lesões, as massas de conídios

envoltos por mucilagens alaranjadas. Os frutos imaturos (120 dias após a floração), logo após o estágio de divisão e diferenciação celular, podem apresentar infecções latentes e, com condições climáticas favoráveis, podem estimular a infecção do patógeno, provocando queda acentuada dos frutos (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015).

FIGURA 2 - SINTOMAS DE *Colletotrichum* spp. EM TECIDOS DESTACADOS DA PLANTA DE CAQUIZEIRO.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: (A), Sépalas (B e C) e sinais do patógeno (D, E e F); sintomas necróticos na face abaxial (G) e adaxial (H), que se desenvolvem sobre a nervura da folha, sinais presentes na folha (I); sintomas típicos de necrose estendida e seca em ramos de ano (velho) (J) e sintomas severos em ramos do ano (novos) (K e L); sintoma em ramo, visualizado em lupa (x40), em (M), na epiderme, e, em (N), no tecido interno; sinais em ramos (O); queda de frutos imaturos, com sintomas de antracnose (P); sintomas em frutos imaturos (Q) e maduros (R), em plantas de caquizeiro 'Fuyu'.

2.4 CICLO DA DOENÇA

Alguns estudos epidemiológicos foram realizados para melhor compreensão do ciclo da doença (antracnose), bem como do ciclo de infecção do patógeno ao

hospedeiro (*D. kaki* L.). Até o momento, os estudos para a cultura do caquizeiro foram desenvolvidos com foco na espécie *C. horii*.

A origem do inóculo no campo ainda é desconhecida para o patossistema em questão, porém há hipóteses de que possa ter sido introduzido no Brasil, por porta-enxertos contaminados, e isso ter auxiliado na dispersão da doença ao longo do tempo, uma vez que a principal técnica propagativa utilizada para a produção de mudas de caquizeiro é a enxertia (FERRI; GIORDANI; BENELLI, 2013). Na China, mais precisamente na província de Zhejiang, na área de Chunan, foram observadas suscetibilidades da doença em porta-enxertos de caquizeiros selvagens (*D. lotus*), que eram utilizados na propagação de mudas, por meio da técnica de enxertia, realizada na principal cultivar Wuheshi plantada da região. Foi relatado que esses porta-enxertos serviam como fonte de inóculo primário e carregavam o patógeno dentro do tecido, proporcionando a introdução do patógeno em áreas inerentes da doença, nessa região da China. Posteriormente, foram relatados sintomas severos da doença no campo e, também, nos ramos das mudas em viveiros (ZHANG, 2008). O patógeno, uma vez presente na área, pode infectar ramos, galhos, troncos, gemas, frutos e folhas (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015) e realizar vários ciclos de infecção na mesma safra.

A disseminação dos conídios ocorre principalmente pelas gotículas da chuva e eles pode ser disseminados a longa distância, pela direção do vento. Dependendo da condição climática e do tamanho da árvore, esses conídios podem ser disseminados até 3 m de altura, em uma planta de caquizeiro (ZHANG, 2008). Kwon et al. (2013) relataram que a maior ocorrência de disseminação dos conídios ocorre nos períodos frequentes de chuvas, geralmente, durante a primavera e início do verão, resultando numa alta incidência da doença no campo. Esses mesmos autores notaram a alta concentração de conídio no ambiente até quatro semanas antes da colheita. Isso resulta em infecções secundárias, em praticamente todo o ciclo produtivo da cultura (até o período de pré-colheita).

O fungo sobrevive internamente nos ramos velhos, entre um ciclo de produção (safra) e outro. No período de inverno, o patógeno fica latente, em forma de micélio, nos cancrios dos ramos ou galhos infectados (ZHANG; XU, 2003; DOLINSKI; GORAYEB; MAY DE MIO, 2015). Em condições de alta umidade e temperatura próxima a 25°C (época da primavera e início do verão), o patógeno presente no

interior dos ramos velhos vai se reproduzir e formar massas de conídios sobre o tecido, podendo estes serem disseminados pelas gotículas da chuva e depositados nos tecidos vegetais suscetíveis da planta de caquizeiro, como ramos novos, ramos ladrões e flores, que são mais facilmente infectados nesse período. Esse processo é considerado, dentro do ciclo de infecção, como a disseminação primária para esse patossistema.

O conídio, em contato com a superfície do tecido vegetal, vai produzir o tubo germinativo e, por meio do apressório, vai penetrar diretamente pela cutícula (ZHANG; HU, 2004). Quando ocorrer o processo de infecção, serão formadas as vesículas, hifas primárias filamentosas, que vão crescer entre as membranas plasmáticas e as paredes das células vegetais, sem penetrar nos protoplastos dos hospedeiros. Após a infecção, a colonização de uma ou mais células pelas hifas primárias (que, nessa fase do ciclo de vida, são consideradas biotróficas), vai dar origem às hifas necrotróficas secundárias, que serão responsáveis por causar ruptura da parede celular (ZHANG; HU; XU, 2005; ZHANG, XU, HE, 2005). Esse processo inicial da infecção é semelhante ao que ocorre com o *C. lindemuthianum*, no feijoeiro, e com o *C. sublineolum*, em sorgo (O'CONNELL et al., 1985; WHARTON; JULIAN; O'CONNEL, 2001).

As flores e ramos novos infectados, em condições climáticas favoráveis, produzirão lesões que vão formar novas massas de conídios, sendo estes conídios considerados como inóculo secundário. Esse inóculo secundário será responsável por causar a infecção secundária no ciclo da doença, que poderá infectar folhas, ramos novos, frutos imaturos e frutos maduros durante o ciclo de produção da cultura. A velocidade e/ou intensidade com que a doença aumenta na área será resultante do tempo em que esse patógeno vai se reproduzir e liberar os conídios para novas infecções, durante o mesmo ciclo de cultivo.

Na Coréia do Sul, onde o período de maior ocorrência de chuvas está relacionado com o mês de julho, e este associado com o início reprodutivo da planta de caquizeiro (KWON; PARK, 2004), foi notada uma alta dispersão de conídios e alta incidência em ramos novos. Após esse período, o índice de dispersão caiu drasticamente, mas o patógeno continuou infectando novos ramos que surgiam e, conseqüentemente, gerando novas esporulações (inóculo secundário). No entanto, após a lignificação desses ramos novos, o patógeno começou a infectar frutos

imaturos que estavam sendo produzidos e, após um tempo, a maioria desses frutos sofreram a queda da planta (KWON et al., 2013). No Brasil, em áreas com alto inóculo do patógeno, são frequentes as observações de frutos imaturos com a lesão de antracnose, caídos no solo (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; DOLINSKI et al., 2016). Portanto, o ramo novo na planta de caquizeiro é fonte de inóculo primário para ocorrência da disseminação dos inóculos secundários e, dessa forma, iniciam as infecções secundárias. No Japão, foi observado que os inóculos provenientes desses ramos novos são capazes de causarem doença nos frutos (ASANO; HIRAYAMA, 2019), associando-se, dessa forma, à infecção secundária que pode ocorrer no patossistema.

Na China, foram observados os sintomas da doença em 4 a 5 dias ou até em 10 dias após um período chuvoso. Esses valores vão se diferenciar dependendo das condições ambientais do ano de cultivo, por exemplo, de 4 a 5 dias, foram observados os sintomas quando ocorreram períodos contínuos de chuva, e, em 10 dias, quando houve períodos nebulosos com chuvas repentinas. Diante disso, o tempo para a produção de inóculo secundário no campo pode variar, dependendo da biologia do patógeno e do hospedeiro, bem como das condições ambientais favoráveis para a ocorrência da doença. No campo, já foi relatada produção de inóculo secundário após 5 a 6 dias do aparecimento dos sintomas (ZHANG, 2008). Em teste de patogenicidade com a cv. Wuheshi, os sintomas foram detectados 70 horas (aproximadamente 3 dias) após a inoculação à temperatura de 25°C e a esporulação, 90 horas após a inoculação (aproximadamente 4 dias); quando submetidas à temperatura de 17°C, as lesões foram formadas após 10 dias da inoculação e a esporulação não foi observada; enquanto, em 15°C, não houve aparecimento dos sintomas da doença (ZHANG; HU, 2004).

A temperatura ótima para o crescimento micelial é de aproximadamente 25°C para a espécie *C. horii* (MAY DE MIO et al., 2015). O pH é importante para a germinação de conídios e a formação de apressório, sendo considerado o intervalo ótimo entre o pH 5,0 e 6,0. Nos testes de patogenicidade, foram observados sintomas em ramos novos quando o pH estava entre 4,0 e 8,0, a 23°C, e as lesões apresentavam esporulações após 80 a 90 horas da inoculação; na temperatura de 17°C e pH 6,0, também foram notadas as lesões da doença após 7 dias de inoculação, porém sem produção de conídios; enquanto, em temperaturas abaixo de

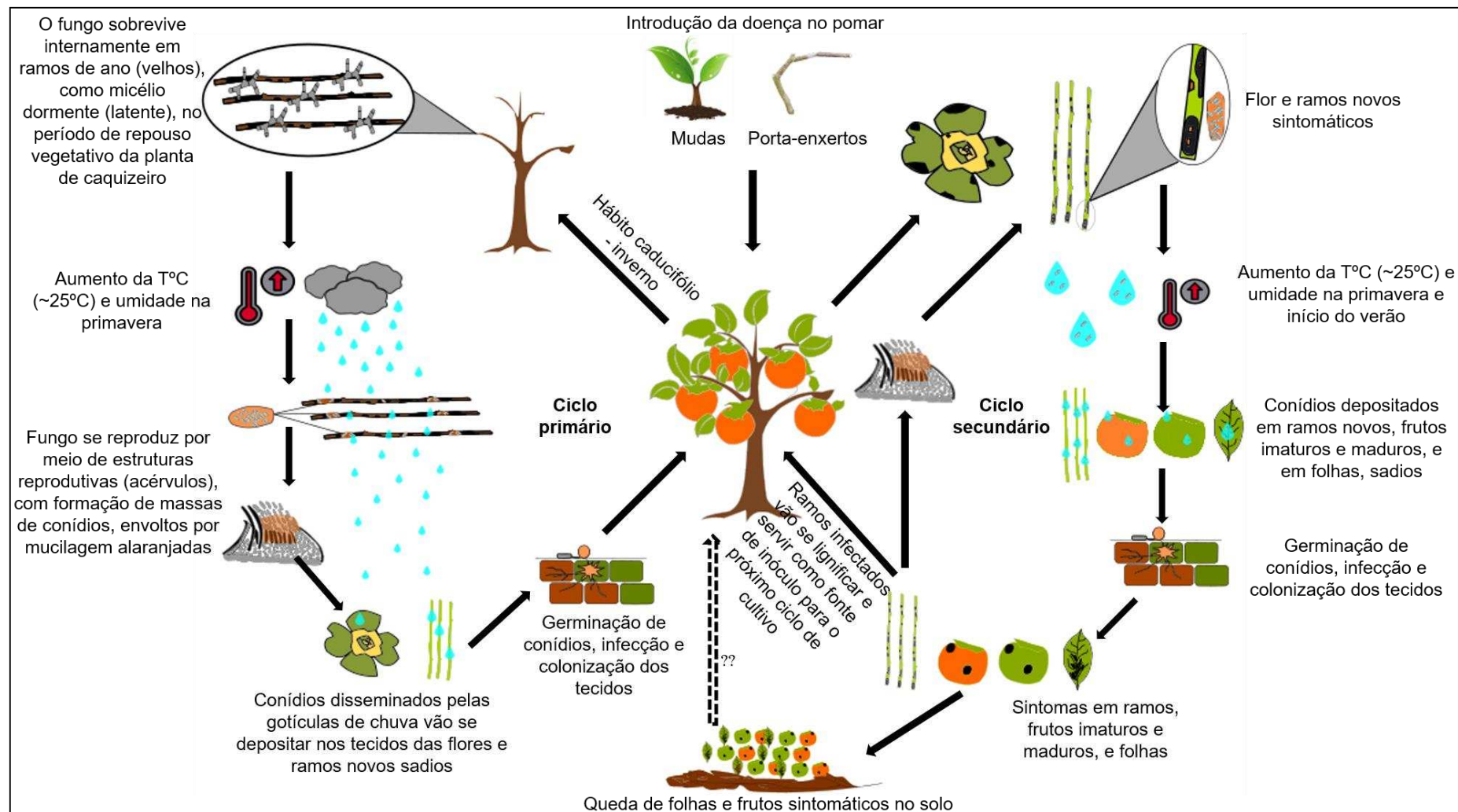
17°C e pH entre 5,0 e 6,0, não foram observados os sintomas da doença (ZHANG; HU, 2004). Xie et al. (2010) observaram que a glucose inibiu a formação de apressório após 12 horas, na concentração de 0,1-5%.

Algumas informações ainda precisam ser esclarecidas, como a importância da infecção latente em flores, o período infeccioso, a etiologia correta desses indivíduos e a frequência dessas espécies no ambiente. Além disso, deve haver mais estudos a níveis de compreensão do ecossistema, fora da propriedade, com o intuito de observar o risco de ocorrência de disseminações de outras plantas frutíferas presentes na área ou em propriedades próximas e que sejam também hospedeiras desses patógenos.

Outro ponto relevante seria investigar possíveis disseminações a longas distâncias, ocasionadas por insetos, por exemplo, abelhas, tratando-se de áreas com diversificação de cultivos, e de outras espécies necessitarem de polinização para o desenvolvimento do ciclo da cultura. Estas podem contribuir no transporte de inóculo, caracterizando a introdução do inóculo primário em área inerente à doença. Para citros, foi relatado que as abelhas podem ser agentes dispersores de conídios das espécies do complexo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, causadoras da podridão floral dos citros – PFC (GASPAROTO et al., 2017).

Diante desse contexto, na tentativa de melhor compreender esse patossistema, neste trabalho, será apresentada uma proposta para o ciclo da antracnose do caquizeiro em forma de figura (FIGURA 3).

FIGURA 3 - CICLO DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO, CAUSADA POR *Colletotrichum* spp., CARACTERIZADA POR MEIO DO LEVANTAMENTO DE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS NO BRASIL E NO MUNDO



FONTE: O autor (2020).

2.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR

Nos primeiros estudos das espécies do gênero *Colletotrichum*, considerava-se que essas espécies apresentavam especificidade em relação ao seu hospedeiro, então, a classificação era realizada quanto a esse critério e mais de 700 espécies foram descritas. Posteriormente, foram adotadas as classificações com base nos caracteres morfológicos e culturais, reduzindo, significativamente, o número dessas espécies descritas (SUTTON, 1980). Os principais métodos tradicionais utilizados para caracterização dos isolados de *Colletotrichum* são: morfologia de conídios e apressórios (tamanho, forma e volume), características culturais das colônias (cor e textura), taxa de crescimento das colônias, testes de patogenicidade nos hospedeiros (SUTTON, 1992). Alguns trabalhos consideraram as características de taxa de crescimento micelial e a coloração da colônia como ferramentas úteis para distinguir espécies de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Foi constatado que a espécie *C. acutatum* apresenta crescimento micelial lento em meio de cultura, quando comparado com a espécie *C. gloeosporioides* (VINNERE, 2004). Para caracterização de isolados de *Colletotrichum* associados com citros, os autores chegaram a caracterizar com base na taxa de crescimento micelial e na coloração da colônia, formando, inicialmente, três grupos (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992). Posteriormente, um grupo foi classificado como *C. gloeosporioides* e os demais como *C. acutatum*. No grupo *C. gloeosporioides*, os isolados apresentavam rápido crescimento micelial e colônia de coloração acinzentada, enquanto os isolados de *C. acutatum* apresentavam crescimento micelial lento e coloração da colônia alaranjada (BROWN; SCREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996).

A coloração das colônias também foi critério para distinguir 72 isolados de *Colletotrichum*, no qual os isolados identificados com coloração rosada à alaranjada foram classificados como *C. acutatum* e os isolados que apresentaram coloração acinzentada foram identificados como *C. gloeosporioides* (BERNSTEIN et al., 1995). Esses mesmos autores identificaram os isolados com base na morfologia dos conídios, sendo identificados os isolados de *C. acutatum*, que produziam conídios fusiformes, e os isolados de *C. gloeosporioides*, que produziam conídios com a extremidade arredonda. Goes e Kimati (1997) também consideraram essas morfologias descritas de conídios para diferenciarem os isolados entre as espécies.

Goes e Kimati (1997) notaram que isolados de *C. gloeosporioides* formavam apressórios com o formato lobado, enquanto os isolados de *C. acutatum* formavam apressórios clavados e arredondados. Em contrapartida, outros trabalhos relataram haver alta diversidade dos tipos de apressórios, por exemplo, Tozze Júnior, Mello e Massola Júnior (2006) observaram, em um único conídio, três tipos diferentes de apressório (circular, ovalado e lobado). Gunnell e Glubber (1992) também relataram alta diversidade morfológica dos apressórios em isolados de morango.

Em caquizeiro, foram relatadas colônias de *C. horii* em meio BDA, com coloração cinza escuro a cinza no verso e, no reverso, coloração cinza escuro a marrom, com zona concêntrica. Os conídios apresentaram formatos cilíndricos, retos ou ligeiramente curvos, com as extremidades obtusas e sem septos. O tamanho dos conídios foi de $17 - 20,5 \times 6,5 - 5,5 \mu\text{m}$, envoltos por mucilagem alaranjada (XIE et al., 2010). Weir e Jhonston (2010) também relataram a coloração cinza da colônia de *C. horii*, aveludada, no verso, e, no reverso, pigmentos marrons, com coloração cinza-esverdeado, e o tamanho médio dos conídios de $17,6 \times 4,8 \mu\text{m}$ para isolados provenientes do Japão. Já isolados da China e Nova Zelândia apresentaram, no verso das colônias, uma coloração de cinza claro a cinza, com massas de conídios alaranjadas, e, no reverso, cinza-esverdeado, e os tamanhos médios dos conídios foram de $21,8 \times 5,0 \mu\text{m}$. Os apressórios apresentaram formatos cilíndricos curtos e levemente lobados. May De Mio et al. (2015) relataram colônias crescidas em meio BDA com coloração iniciando branco da margem para cinza no centro do verso da placa, e, no reverso, a coloração cinza escuro, com zonas concêntricas. Os formatos dos conídios também foram cilíndricos, com as extremidades obtusas, e a temperatura ótima para o crescimento micelial foi de aproximadamente 25°C.

Nota-se que existe diversidade entre as descrições morfológicas para os isolados de *C. horii*, até então, o agente causal predominante da antracnose do caquizeiro no Brasil e no mundo. Porém, com o relato de outras espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do caquizeiro (HASSAN et al., 2018; HASSAN; LEE; CHANG, 2019; WANG et al., 2016), essa diversidade fenotípica pode ser ainda maior na população de isolados, e caracterizações apenas com base nos critérios morfoculturais podem ser incorretas, devido, principalmente, aos fatores ambientais que possam interferir na estabilidade dos caracteres morfoculturais (CAI et al., 2009). Contudo, ressalva-se que esses exemplos apresentados anteriormente, apesar

de não serem suficientes para a identificação de espécies de *Colletotrichum*, podem fornecer também informações de conhecimento a respeito da diversidade de uma população de patógeno, devido, ainda, aos estudos de caracterização de espécies de *Colletotrichum* considerarem esses critérios como base primária para diferenciação (KATAN, 2000).

As ferramentas moleculares associadas com essas caracterizações tradicionais têm sido utilizadas para os estudos de caracterização das espécies de *Colletotrichum* (DAMM et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Essa análise multilocus tem sido ferramenta útil para separar as espécies dentro dos complexos de *Colletotrichum*. Inicialmente, a comparação de sequências da região ITS 1 do rDNA entre as espécies de *Colletotrichum* resultou no desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) táxon-específicos para a diferenciação entre *C. gloeosporioides* (CgInt/ITS4) e *C. acutatum* (CaInt2/ITS4) (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1996). Entretanto, essa análise com os táxons-específicos possibilita apenas a distinção entre os complexos de *Colletotrichum*, mas não entre as espécies que estão dentro de cada complexo.

O desenvolvimento da análise molecular foi impulsionado pela descoberta da reação em cadeia de polimerase (PCR), a qual se trata do método que permite amplificar várias cópias de uma região do DNA de um indivíduo de interesse. A região do espaço internotranscrito do DNA ribossômico (ITS-rDNA), localizada entre as subunidades 18S e 28S, é indicada como *barcode* universal para a identificação de fungos (SCHOCH et al., 2012). Para algumas espécies de *Colletotrichum*, essa região é suficiente para separar das demais, por exemplo, na *C. horii*, é bastante informativa para separar das demais espécies do complexo *C. gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Porém, o uso somente dessa região para discriminar espécies próximas deve ser evitado, devido à baixa variação entre os nucleotídeos em algumas espécies (CANNON et al., 2012). Outro fator que deve ser levado em consideração, quando se utiliza apenas a amplificação com a região ITS-rDNA, é que muitas sequências estão depositadas com o nome errado no banco internacional de genomas (GenBank) (HYDE et al., 2009; CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009).

A análise filogenética *multilocus* é necessária para a identificação e separação das espécies de *Colletotrichum*, sendo, além da região ITS-rDNA, recomendada a amplificação baseada em regiões codificantes parciais dos genes gliceradeído-3-

fosfato desidrogenase (GAPDH), β -tubulina 2 (TUB2), actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CHS-1), glutamina sintetase (GS), histona 3 (HIS3), manganês superóxido dismutase (SOD2), fator de alongação 1- α (EF1- α) e região intergênica entre Apn2 e Mat 1-2 (ApMat) (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012; SHARMA et al., 2013; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Vieira et al. (2020) sugerem que amplificações parciais dos genes como GAPDH ou TUB2 podem ser utilizadas como iniciais para diferenciação do complexo de espécies de *Colletotrichum*.

Para realização dessa análise filogenética, existem diferentes métodos computacionais, com suportes matemáticos que vão fornecer distâncias (agrupamento) que são compreendidas como a fração dos sítios que diferem entre as sequências dos isolados no alinhamento, de tal forma que um par de sequências com similaridade entre si serão mais próximas evolutivamente, ou que estão intimamente relacionadas, e que estas reflitam o seu estado de evolução (WILEY, 1981). Vários isolados podem representar uma espécie, pois sequências individuais ligadas à filogenia molecular estão associadas com isolados únicos ou *strains*.

Além dos métodos de distâncias, existem os métodos de análises filogenéticas, que envolvem um critério de otimização, baseado na adequação dos caracteres na árvore. Esses métodos fornecem maior suporte para as análises quando comparados com os de distâncias. Os métodos mais usados são: de parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana.

Neste trabalho, será abordada a análise filogenética, com base na inferência bayesiana, a qual fornece informação de distribuição *a posteriori* dos parâmetros genéticos, possibilitando estimativas de intervalos de confiança, que são melhor definidos como intervalos de probabilidade ou intervalos de confiança Bayesiano exatos para as estimativas dos parâmetros genéticos. Por essa razão, é considerada uma das análises mais completas, pois propicia uma melhor confiabilidade desses parâmetros (WACULICZ-ANDRADE, 2013). Por meio da reconstrução filogenética, a partir das sequências de fragmentos de DNA, é possível determinar o relacionamento entre diferentes taxas e, uma vez reconstruída, possibilita mapear características morfológicas dentro da árvore. Em resumo, a reconstrução de uma árvore filogenética ocorre em vários passos, vai desde o sequenciamento correto, seguido da análise dos fragmentos de DNA dos iniciadores (*forward* e *reverse*) e obtenção de sequência consenso. Após isso, os fragmentos do DNA obtidos são alinhados com

os demais (coletados da literatura), que vão ser analisados na filogenia. Posteriormente, são determinados os modelos evolutivos que serão aplicados para cada região genômica utilizada na análise e, assim, inicia-se o processo da geração da árvore, que vai envolver a matriz de caracteres, a análise dessa matriz e, conseqüentemente, a árvore será gerada e interpretada.

Além de todas essas etapas para a realização do trabalho de caracterização, são necessários também os testes de patogenicidade para confirmação se o indivíduo isolado de uma determinada planta é patogênico a esse hospedeiro. Mediante os ensaios de patogenicidade, é possível determinar parâmetros epidemiológicos, como período de incubação, latência e infeccioso, que serão importantes para a compreensão da epidemia, pois fazem parte das etapas do ciclo de infecção do patógeno (MANANDHAR; HARTMAN, 1995).

Para o caquizeiro, considerando-se que esses patógenos são capazes de infectar diferentes tecidos vegetais da planta (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; MAY DE MIO et al., 2015), os ensaios de patogenicidade relacionando os tecidos e isolados de diferentes espécies possibilitam obter algumas respostas quanto à especificidade dessas espécies ao hospedeiro, bem como a agressividade, podendo ser mensurados as incidências (%) e o diâmetro da lesão (mm). Em uma revisão do gênero *Colletotrichum*, os autores discutiram as diferenças entre as espécies dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* quanto à especificidade à infecção de diferentes tecidos da planta. Por exemplo, as espécies de *C. acutatum* são mais frequentes, causando podridão em frutos, enquanto as espécies de *C. gloeosporioides* causam mais doenças em órgãos vegetativos. Porém, isso não é uma regra, visto que já se conhecem isolados de ambos os complexos causando doença tanto em órgãos vegetativos, quanto em reprodutivos, bem como diferentes níveis de agressividade podem ocorrer entre isolados dentro de um mesmo complexo (DOWLING et al., 2020). Hassan et al. (2018) relataram diferença no tamanho da lesão em frutos de caquizeiro com fermento, quando inoculados com isolados da espécie *C. siamense* e *C. horii*, sendo observadas maiores lesões para os isolados de *C. siamense*.

Devido à grande presença de espécies de *Colletotrichum* como agentes fitopatogênicos, por exemplo, nos EUA, foi feito um levantamento de 21 espécies como agentes causais para podridão amarga em macieira, 15 causando antracnose

em morangueiro e 12 espécies causando podridão em videira no mundo (DOWLING et al., 2020). Além de distinguir todas essas espécies com base nos caracteres morfofisiológicos, patogênicos e moleculares, também é necessário compreender os ciclos de vida de cada indivíduo e, dessa forma, o manejo da antracnose acaba se tornando um verdadeiro desafio, devido tanto à ampla gama de hospedeiros suscetíveis (LIMA et al., 2015), quanto à diversidade da virulência existente entre essas espécies (TALHINHAS et al., 2015). Compreender a diversidade de patógenos, a interação patógeno-hospedeiro-ambiente, a sensibilidade do fungo aos fungicidas, certamente contribuirão nas decisões sobre as medidas adequadas para o controle da doença (CAI et al., 2009; KAMEI et al., 2014; TALHINHAS et al., 2015).

2.6 CONTROLE QUÍMICO PARA A ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO

O controle químico é um dos métodos mais importantes para o controle da antracnose, porém apenas esse método não é suficiente para controlar a doença (ZHANG, 2008; KWON et al., 2013). Para o caquizeiro, o manejo integrado dos métodos culturais e químicos, associados com a adequada nutrição da planta, são os pontos cruciais para o manejo racional e sustentável dessa cultura, de forma que, ao longo do tempo, o inóculo presente na área vai se estabilizando e, conseqüentemente, a incidência da doença vai ser menor (MAY DE MIO et al., 2019).

O recomendado para o caquizeiro é que essas pulverizações iniciem de forma preventiva, antes e durante a floração, com o objetivo de impedir a disseminação do inóculo primário antes do período das chuvas e aumento das temperaturas. Caso ocorram longos períodos de chuvas, é necessária a aplicação logo em seguida, para a proteção da superfície dos tecidos suscetíveis à infecção do patógeno (PLOETZ, 2007). No entanto, ainda não há trabalhos que forneçam dados de eficiência desses produtos para o controle da antracnose do caquizeiro no Brasil. Outro grave problema enfrentado pelos produtores são os poucos produtos fitossanitários registrados para a cultura (TABELA 1) (AGROFIT 2020).

Apenas os fungicidas inorgânicos à base de cobre, o produto alternativo, com extrato de melaleuca, e o produto biológico de *Bacillus subtilis* estão recomendados para a antracnose do caquizeiro (TABELA 1). Dentre os produtos registrados, a maioria são pertencentes aos grupos químicos dos IQe e IDM, os quais

apresentam risco alto e médio para seleção do fungo resistência, respectivamente (FRAC, 2020). Diante disso, a recomendação de estratégias de controle fica muito limitada, pois não há opções suficientes para a rotação de ingredientes ativos, com diferentes modos de ação e, conseqüentemente, os fungicidas podem resultar em perdas da eficiência no campo, caso não sejam adequadamente manejados.

Além disso, vale uma ressalva para o produto à base de melaleuca. Ele está recomendado para o controle da antracnose, porém o alvo é a *Glomerella cingulata*, fase sexual do fungo *Colletotrichum*. Até então, não se tem conhecimento dessa fase presente no Brasil e no mundo para o caquizeiro (TABELA 1). Dessa forma, seria importante rever a recomendação do alvo para não gerar interpretações erradas, pois a fase sexuada do patógeno pode implicar diferentes respostas epidemiológicas, bem como interferir no controle da doença.

TABELA 1 - PRODUTOS COMERCIAIS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO CAQUIZEIRO NO BRASIL

NOME COMERCIAL	INGREDIENTE ATIVO (i.a.)	NOME DO GRUPO (FRAC#)	DOENÇAS	
			Nome comum	Nome do patógeno
Amistar Top (Bayer CropScience)	Azoxistrobina Difenoconazol	Qol (#11) DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Pseudocercospora kaki</i>
Avura (Syngenta)	Azoxistrobina Difenoconazol	Qol (#11) DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Pseudocercospora kaki</i>
Curygen EC (Avgust)	Difenoconazol	DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Pseudocercospora kaki</i>
Difcor 250 EC (Cross Link)	Difenoconazol	DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Pseudocercospora kaki</i>
Nativo (Bayer CropScience)	Trifloxistrobina Tebuconazol	Qol (#11) DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Pseudocercospora kaki</i>
Mythos (Syngenta)	Pirimetanil	AP (#9)	Mofo cinzento	<i>Botrytis cinerea</i>
Fungitol Verde (Mitsui)	Oxicloreto de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Cobre Fersol (Ameribras)	Oxicloreto de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Cobre Fersol (Ameribras)	Oxicloreto de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Funguran Verde (Funguran)	Oxicloreto de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Sulfato de Cobre Inderco (MCM)	Sulfato de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Sulfato de Cobre Microsal (Microsal)	Sulfato de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Tutor (BASF)	Hidróxido de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Timorex Gold (Stockton Agrimor)	Melaleuca altemifolia, extrato de folhas (terpenos)	-	Antracnose	<i>Glomerella cingulata</i>
Serenade (Bayer CropScience)	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Mofo Cinzento Antracnose	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum</i> spp.

FONTE: O autor, adaptado do AGROFIT (2020).

Os fungicidas multisítios (inorgânicos) possuem ação protetora e são inespecíficos quanto ao seu modo de ação. Há relatos de que possam acumular e reagir sobre ou fora da membrana celular, podendo atuar em várias partes da célula onde haja atividade metabólica e inibir diversos processos vitais dos patógenos. Historicamente, esses fungicidas apresentam de moderada a boa eficiência no controle de doenças de plantas. Estão inclusas nesse grupo as doenças causadas por *Colletotrichum* spp. (DOWLING et al., 2020).

O grupo químico dos inibidores da quinona externa (IQe), que, neste estudo, incluem os ingredientes ativos azoxistrobina e trifloxistrobina, são pertencentes à classe das estrobilurinas, que é a mais comum e importante classe dentro do grupo químico dos IQe, devido estarem presentes no manejo químico de ampla gama de doenças fúngicas (SIEROTZKI, 2015). Esses fungicidas têm, como modo de ação, a interferência dos processos de produção de energia (ATP) durante a respiração mitocondrial, que está vinculada à ligação do sítio da quinona-oxidase (Qo), presente no gene citocromo *b* (*cyt b*). Dessa forma, vai bloquear a transferência de elétrons entre o citocromo *b* e o *c1*, que estão situados internamente na membrana mitocondrial dos fungos (complexo III), impedindo a formação de ATP (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010; LEADBEATER, 2012). Os fungicidas desse grupo têm, como principal ação, atuar na fase mais sensível do desenvolvimento dos fungos, que é o momento da germinação dos esporos (OLIVER; HEWITT, 2014).

Os fungicidas do grupo químico dos IDM, que incluem os ingredientes ativos difenoconazol e tebuconazol, pertencem ao subgrupo dos triazóis e têm, como mecanismo de ação, atuarem na inibição da biossíntese de esterol, principalmente no ergosterol, que é responsável pela manutenção da integridade da membrana e da rota sintética dos fungos. A inibição desse processo pode interferir na disponibilidade de ergosterol e resultar na ruptura da membrana (OLIVER; HEWITT, 2014; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). Além disso, inibem a desmetilação oxidativa no processo que tem, como sítio específico de ação, a enzima C14 α desmetilase (enzima CYP51) do citocromo P450, que é responsável por catalisar processos oxidativos para a formação do ergosterol (LUPETTI et al., 2002). O estresse causado na membrana celular resulta no aumento da permeabilidade, causando extravasamento dos conteúdos intracelulares, o que, por sua vez, limitará

o crescimento fúngico (BUCHENAUER, 1987; LUPETTI et al., 2002; REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Os fungicidas do grupo químico das anilino pirimidinas (AP) atuam na inibição da biossíntese de metionina e exibem forte atividade preventiva, baseada na inibição do tubo germinativo do fungo, na formação do apressório e no crescimento micelial (GISI; MÜLLER; HALL, 2019). Para o caquizeiro, o ingrediente ativo que está registrado para controle de doenças é o pirimetanil. Esse fungicida também vai atuar no processo de penetração e infecção do fungo no tecido do hospedeiro, devido à inibição da secreção de enzimas hidrolíticas durante esses processos e tem ação sistêmica na planta. Portanto, esse fungicida pode exibir atividade protetora e curativa, além de ter resistência às precipitações, o que o torna uma boa opção para inclusão nas estratégias de controle de doenças (TÖFOLI et al., 2015; GISI; MÜLLER; HALL, 2019).

2.6.1 Sensibilidade de *Colletotrichum* spp. a fungicidas

Independente do manejo adotado, seja ele químico, alternativo ou cultural, é importante conhecer a variabilidade do patógeno que está controlando, pois existe grande diversidade de respostas fisiológicas e adaptativas de isolados de uma mesma espécie. Os fungos têm a capacidade de se multiplicar e gerar diversidade de indivíduos, que serão favorecidos na seleção de linhagens e populações resistentes, que possam surgir aleatoriamente ou serem induzidas (TOZZE JUNIOR; MELLO; MASSOLA JUNIOR, 2006).

A resistência de patógenos aos fungicidas é definida quando ocorre mutação no gene do sítio específico do fungicida, devido a alguns fatores, como exposição contínua de determinado produto ou o aumento da dose recomendada, exercendo, dessa forma, pressão de seleção à população do patógeno (LOPES et al., 2015). Em uma população de isolados na qual não há evidências de genótipos de resistência pode vir a ser observada uma mudança da sensibilidade do fungo à fungicida. O termo "sensibilidade reduzida - SR" é muito utilizado nesse caso. Para definir se a população de isolado está sofrendo alterações na sensibilidade ao longo do tempo, esta precisa ser comparada com uma população linha-base. O termo linha-base, do inglês *baseline*, representa a variação da sensibilidade natural ou inicial em

populações de patógenos, antes de serem expostos a determinado fungicida (RUSSELL, 2004).

A resistência prática para os fungicidas do grupo químico dos IQe's é tipicamente causada por mutações que ocorrem no gene citocromo *b* (*cytb*) (MA; MICHAILIDES, 2005). As mutações que mais ocorrem são reportadas nas substituições dos aminoácidos, nas posições 129, 137 e 143 (FRAC, 2020). A mutação que ocorre na mudança de glicina para alanina no códon 143 (G143A) resulta em maior probabilidade de ocorrência de resistência qualitativa (completa) e, conseqüentemente, vai ocasionar total falta de controle no campo. As outras substituições, como de fenilalanina para leucina, no códon 129 (F129L), e de glicina para arginina, no códon 137 (G137R), expressam resultados de resistência moderada ou parcial, os quais são possíveis de serem manejadas (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008; FISHER et al., 2004). Nos EUA, a mutação G143A foi reportada para os isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* de macieira, morangueiro, mirtilheiro, pessegueiro e pistache (HU et al. 2015; FORCELINI et al. 2016; JOHNSON, 2018; LICHTENBERG et al., 2018; CHECHI et al., 2019), enquanto a mutação F129L foi reportada para os isolados de *C. acutatum* que infectam morangueiro (FORCELINI et al., 2016).

Os fungicidas do grupo químico dos IDM's têm, por natureza, o fato de apresentarem resistência do tipo quantitativa, a qual é poligênica, resultante da interação de vários genes, que vão desempenhar diferentes níveis de resistência (LUPETTI et al., 2002). Devido a isso, os manejos antirresistências para esses fungicidas têm melhor efeito quando comparados com os fungicidas dos IQe's. O mecanismo de resistência para esses fungicidas ocorre por meio de mutações no gene 14 α – desmetilase (CYP51) ou por mecanismos alternativos, como a overexpressão gênica (MA; MICHAILIDES, 2005), porém nem sempre resultam em substituições dos aminoácidos ligados aos fenótipos de resistência (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007).

Outro mecanismo alternativo de resistência que pode ocorrer é o aumento do efluxo dependente de energia, que causará diminuição do acúmulo de fungicida intracelular, visto que os transportadores de drogas ligados à membrana têm a capacidade de secretar compostos antifúngicos para o espaço extracelular das células do micélio e previnem o acúmulo do fungicida no sítio-alvo do fungicida (DE

WAARD et al., 2006). Em uma revisão de literatura do citocromo P450, foi relatado que as mutações no gene CYP em diferentes organismos podem estar associadas com a perda da afinidade e expressão desse gene, promovidas por uma ou mais modificações genéticas (KELLY; KELLY, 2013).

A resistência prática vinculada ao grupo químico das anilinopirimidinas parece ter se estabilizado, sugerindo custo de adaptabilidade às mutações. A maioria dos isolados resistentes exibem apenas níveis baixos ou moderados de resistência, sendo poucos isolados relatados com nível alto (GISI; MÜLLER; HALL, 2019). Essa distribuição da frequência dos isolados pode refletir em fenótipos mais fracos de resistência, os quais, em vários estudos, incluindo mutantes de laboratório e cepas de campo, isolados sensíveis e resistentes permanecem igualmente patogênicos na ausência de tratamento com fungicida, e a resistência específica à anilinopirimidina não parece afetar características de aptidão, como taxa de crescimento micelial, produção de esporos ou conídios (LEROCH et al., 2013; FERNANDEZ-ORTUÑO; CHEN; SCHNABEL, 2013; LEROUX et al., 2012; MALANDRAKIS et al., 2015). Estudos de adaptabilidade, usando misturas de isolados sensíveis e resistentes, indicam que isolados resistentes são superados, em grande parte, por isolados sensíveis, após pequeno número de transferências sucessivas (FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2014; LARSEN et al., 2012; AVENOT; MICHAILIDES, 2015). Embora exista risco inerente de seleção da resistência às anilinopirimidinas em populações de campo, a frequência não seguiu a mesma dinâmica observada para outros mecanismos de sítio específico, como os IQe's.

Estudos de monitoramento da sensibilidade de *Colletotrichum* spp. aos fungicidas ainda são escassos para a antracnose do caqui no Brasil, o que acaba dificultando propor manejos químicos adequados para o controle da doença. Em estudo prévio da sensibilidade de *Colletotrichum* spp. aos fungicidas registrados para o caqui, foram observada uma sensibilidade alterada para os ingredientes ativos dos grupos químicos dos IQe's e IDM's, que nem estão registrados para o controle da antracnose, mas sim para a cercosporiose (CARRARO et al., 2019). Esse fato torna a questão ainda mais preocupante, pois a maioria dos produtos registrados são desses grupos químicos e os ingredientes ativos desses grupos têm risco alto (IQe) e médio (IDM) de selecionar a resistência do fungo (FRAC, 2020).

Algumas espécies podem apresentar diferentes respostas à pressão de seleção de fungicidas e estes serem mais sensíveis ou resistentes a alguns produtos, como relatado para os complexos de *Colletotrichum* (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; MUNIR et al., 2016; PERES et al., 2005; VALERO et al., 2010) e entre espécies do mesmo complexo. Essas diferenças foram observadas para as espécies *C. fructicola* e *C. siamense*, pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, causadoras da antracnose em pêssego, na Carolina do Sul, EUA (HU; GRABKE; SCHNABEL, 2015).

Dowling et al. (2020) relataram alguns pontos importantes para a compreensão das diferentes respostas à sensibilidade entre os isolados de *Colletotrichum*. Os autores discutem que as diferenças de sensibilidade a fungicidas entre espécies de mesma localização geográfica podem ser inerentes ou podem ter surgido como resultado da pressão de seleção de fungicidas, influenciada por frequências e densidades de inóculos de espécies-específicas e/ou influxo de isolados com fenótipos sensíveis, provenientes de hospedeiros próximos. Esse fato, portanto, torna ainda mais importantes os estudos de etiologia dos agentes causais.

CAPÍTULO I
CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE
ESPÉCIES DE *Colletotrichum*, CAUSADORAS DA ANTRACNOSE DO
CAQUIZEIRO NO BRASIL

RESUMO

O principal agente causal da antracnose do caqui é o fungo *C. horii*. No entanto, diferentes espécies também vêm sendo relatadas como agentes causais da doença. Os estudos de identificação de espécies de *Colletotrichum* eram realizados com base apenas nos caracteres morfofisiológicos e patogênicos. Porém, diante da diversidade genética presente nessas espécies, apenas esses critérios de identificação não são suficientes para sua correta identificação, sendo necessárias identificações com base em análises filogenéticas. A identificação e caracterização correta desses patógenos são fundamentais para estabelecer as bases dos estudos epidemiológicos e de controle da doença. Os objetivos deste capítulo são: (i) identificar as espécies de *Colletotrichum* que estão causando antracnose do caqui no Brasil, com base nos caracteres morfológicos, fisiológicos, patogênicos e moleculares, por meio de análise multilocus de três regiões genômicas (ITS, GAPDH e TUB2); (ii) testar a agressividade desses isolados em diferentes tecidos destacados da planta de caqui (*ex vivo*); e (iii) investigar possíveis patogenidades cruzadas entre diferentes frutíferas de clima subtropical, com testes de patogenidade *ex vivo* e *in vivo*. A análise *multilocus* de inferência Bayesiana revelou a presença de quatro agentes causais: sendo *C. horii* e *C. fructicola*, pertencentes ao complexo *C. gloesporioides* (cCg), e os isolados de *C. nymphaeae* e *C. melonis*, pertencentes ao complexo *C. acutatum* (cCa). Diferentes aspectos morfológicos foram observados entre as espécies. O efeito da temperatura ótima no crescimento micelial e germinação de conídios foi similar entre os isolados pertencentes ao cCg e cCa. Todos os isolados causaram doença nos tecidos de caqui destacados, com e sem fermento, mas foram observadas diferenças de agressividade entre os isolados. Os isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados na patogenidade cruzada também causaram lesão em caqui, macieira e pereira, exceto no isolado de *C. horii*, que não infectou frutos de pereira. Este trabalho trouxe novas informações etiológicas a respeito dos agentes causais da antracnose do caqui no Brasil.

Palavras-chave: Etiologia. *Diospyros kaki* Thunb. Doença de planta.

ABSTRACT

The principal causal agent of persimmon anthracnose is the fungus *C. horii*. Although, recently, different species have also been related as causal agent of this disease. The studies to identify the species of *Colletotrichum* were conducted based solely in the morphophysiological and pathological characters. However, due to the genetic diversity found in this species, solely these criteria of identification were not enough to their proper recognition, being necessary to identify with molecular support of multilocus analysis. The proper identification and characterization of these pathogens is elementary to establish the basis of the epidemiological and disease control studies. The purposes of this section were: (i) to identify the species of *Colletotrichum* causing the persimmon anthracnose in Brazil, based in morphological, physiological, pathogenic, and molecular characters, through multilocus analysis of three genomic regions (ITS, GAPGH and TUB2); (ii) to test the aggressiveness of these isolates in several plant tissue detached of persimmon (*ex vivo*); and (iii) to research possible cross-pathogenicity in different fruitful tree of subtropical climate, with pathogenic assays *ex vivo* and *in vivo*. The multilocus analysis of Bayesian inference revealed the presence of four causal agents, *C. horii* and *C. fructicola*, from the complex of *C. gloesporioides* (cCg), and the isolates of *C. nymphaeae* and *C. melonis*, from the complex *C. acutatum* (cCa). Different morphological aspects were observed between the species. The effect of optimal temperature for mycelial growth and conidia germination belonging to the cCg and cCa were similar. All the isolates caused the disease in the plant tissue detached of persimmon, with and without wounded, but it was observed aggressivity disparities between the isolates; the isolates of *Colletotrichum* ssp. used in the cross-pathogenicity also caused lesion in persimmon, apple and pear, except the isolate of *C. horii* which did not infected the pear fruits. This study revealed new etiological information regarding the causal agent of persimmon anthracnose in Brazil.

Keywords: Etiology. *Diospyros kaki* Thunb. Plant Disease.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto maior produtor de caqui (*Diospyros kaki* Thunb.) e a produção está concentrada nas regiões Sul e Sudeste do país (IBGE, 2018). No entanto, na última década, tem-se observado queda drástica da produção de caqui no cenário nacional, associada, pelo menos em parte, à ocorrência de antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*. A antracnose é a doença mais importante para a cultura por apresentar maior incidência e severidade nos tecidos infectados. O patógeno pode infectar diferentes tecidos da planta, como flores, ramos, folhas, frutos imaturos e maduros, provocando danos severos, como quedas prematuras dos frutos e, conseqüentemente, causando reduções nas produções (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; DOLINSKI et al., 2016). Na China, maior produtor mundial, houve relatos de reduções de até 90% da produção, mesmo em áreas com aplicações de produtos fitossanitários (DENG et al., 2019).

O agente causal foi, primeiramente, descrito como *Gloeosporium kaki*, por Shotari Hori (1910) e Seiya Ito (1911). Posteriormente, foi descrito, na Itália, como *Colletotrichum kaki*, sendo patógeno de mancha foliar em caqui (MAFFEI, 1921). Esses dois patógenos descritos anteriormente foram reclassificados com base nos caracteres morfológicos e considerados o mesmo patógeno, também sinônima de *C. gloeosporioides* (VON ARX, 1957). Após a caracterização com ferramenta molecular, esse patógeno foi identificado como *C. horii* (WEIR; JOHNSTON, 2010), que, mais tarde, com a reclassificação filogenética, foi separado dentro do complexo *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Até recentemente, essa era a única espécie relatada como agente causal da antracnose do caquizeiro no mundo (MAY DE MIO et al., 2015; DENG et al., 2019). Porém, têm sido reportados novos agentes causais dessa doença, como as espécies *C. acutatum* nos EUA (WILLIAMSON; SUTTON, 2010); *C. karstii* na China (WANG et al., 2016); *C. siamense* e *C. nymphaeae* na Coreia do Sul (HASSAN et al., 2018; HASSAN; LEE; CHANG, 2019). Estudos da sistemática de *Colletotrichum* spp. foram modificados após o advento das análises moleculares, sendo muitas espécies separadas em "complexos" (CANNON et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012).

No Brasil, basicamente, os estudos sobre essa doença no caquizeiro estão concentrados no estado do Paraná, onde ocorreram os primeiros relatos de epidemias (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; MAY DE MIO et al., 2015). Além de *C. horii*, recentemente, foram identificados três novos agentes causais da antracnose do caquizeiro no Brasil (CARRARO et al., 2019). Por essa razão, alguns questionamentos foram levantados se poderia haver uma diversidade genética de espécies causando antracnose do caquizeiro no Brasil. Diante de tantas lacunas que ainda precisam ser estudadas e compreendidas para a correta adoção de estratégias de controle dessa doença, estudos de identificação e caracterização desses agentes causais ganharam importância para serem elucidados.

As identificações dos patógenos eram, tradicionalmente, realizadas apenas com base em critérios morfológicos, como: coloração de colônias, formato de conídios e apressórios, produção de peritécio (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998), taxa de crescimento micelial em meio BDA (SUTTON, 1992), bem como sensibilidade ao fungicida benomil (VALERO et al., 2010). No entanto, essas características fenotípicas podem variar em diferentes condições de ambiente, as quais, muitas vezes, não são adequadas para distinguir espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009). A maioria dos estudos de caracterização de espécies tem amplificado a região do Espaço Interno Transcrito (ITS) do DNA ribossomal, porém, para a maioria de *Colletotrichum* spp., a amplificação dessa região serve apenas para distinguir espécies entre complexos de *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012; HYDE et al., 2009). Para separar as espécies pertencentes ao mesmo complexo, é necessária a análise filogenética *multilocus* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012). Alguns trabalhos sugerem que, além da região ITS-rDNA, a amplificação dos genes parciais gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina (TUB2) são suficientes para distinguir algumas espécies de *Colletotrichum* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012; VELHO et al., 2015; VIEIRA et al., 2020).

A abordagem polifásica, que combina a análise multilocus, com descrição morfológica e fisiológica das espécies, teste de patogenicidade, análise da produção de metabólitos e estudos ecológicos (LIU et al. 2016), tem sido efetiva para identificação de espécies de *Colletotrichum* (PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012). Além disso, estudos têm demonstrado habilidades de *Colletotrichum* spp. em

causar infecções cruzadas (PERES et al., 2002; LAKSHMI et al., 2011; PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012; PENG et al., 2013; BRAGANÇA et al., 2016), sendo capaz de causar doença em diferentes hospedeiros ou um único hospedeiro pode ser infectado por diferentes espécies (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Diante dos recentes relatos de espécies de *Colletotrichum* em outras frutíferas de clima subtropical no Brasil, como macieira, pereira, videira, pessegueiro - geralmente, essas culturas também estão presentes em áreas de produção de caqui - foi levantada a hipótese de que poderiam ocorrer infecções cruzadas entre tais indivíduos.

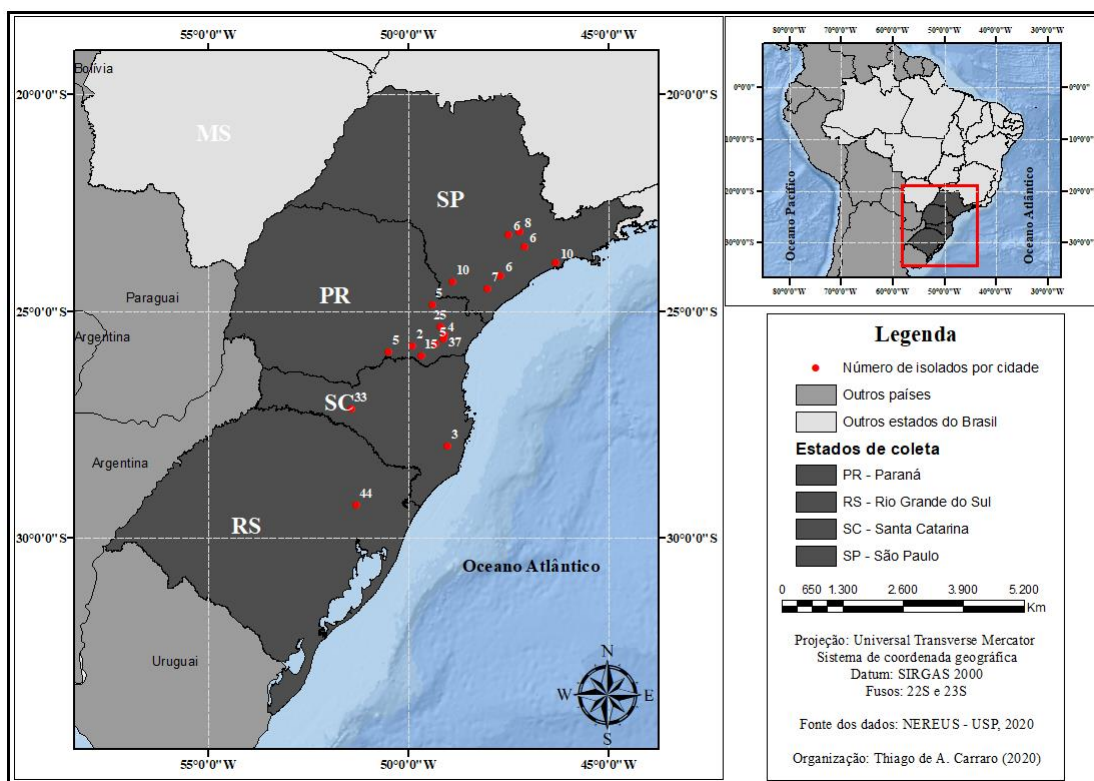
Considerando esses novos fatos, a identificação correta dos agentes causais é fundamental para fornecer a base dos estudos epidemiológicos e de controle da doença. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram: i) identificar espécies de *Colletotrichum* que estão causando antracnose do caqui no Brasil, com base nos caracteres morfológicos, fisiológicos, patogênicos e moleculares; ii) testar a agressividade desses isolados em tecidos destacados (*ex vivo*); e iii) investigar possíveis patogenidades cruzadas entre diferentes frutíferas de clima subtropical, com testes de patogenidade *ex vivo* e *in vivo*.

2 METODOLOGIA

2.1 COLEÇÃO DE ISOLADOS

Foram obtidos 231 isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes órgãos vegetais sintomáticos (ramos novos e frutos), que apresentavam lesões enegrecidas, deprimidas, ovais, típicas da antracnose, e de flores visualmente assintomáticas, de diferentes cultivares de caquizeiro. Os isolados foram coletados em três momentos distintos e foram provenientes de duas safras de produções de caqui (2017/18 e 2018/19). Na safra 2017/18, foram realizadas duas coletas: i) na época entre o florescimento e o início da produção dos frutos (frutos verdes), em meados dos meses de setembro a novembro de 2017. Durante essa amostragem, 57 isolados foram obtidos de flores e ramos de áreas de produções comerciais, dos estados de São Paulo e Paraná; ii) coleta de frutos nos meses de abril a junho de 2018, totalizando 97 isolados. Na safra 2018/19, a coleta foi realizada nos meses de abril a junho de 2019, obtendo um total de 77 isolados de frutos. Ao todo, foram obtidos isolados de quatro diferentes regiões produtoras de caqui no Brasil, nos estados de São Paulo (SP, 53 isolados), Paraná (PR, 98 isolados), Santa Catarina (SC, 36 isolados) e Rio Grande do Sul (RS, 44 isolados) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - MAPA DA OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., AGENTES CAUSAIS DA ANTRÁCNOSE DO CAQUIZEIRO (*Diospyros kaki* Thunb.) NO BRASIL, PROVENIENTES DOS ESTADOS DE SÃO PAULO (SP), PARANÁ (PR), SANTA CATARINA (SC) E RIO GRANDE DO SUL (RS)

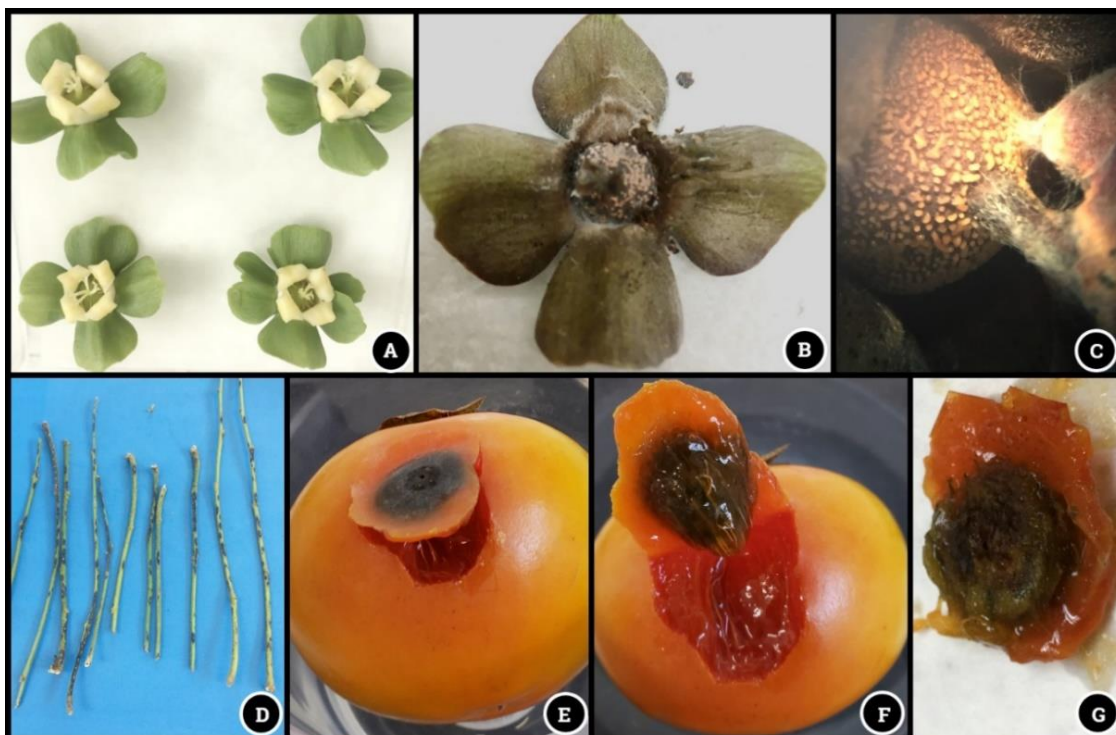


FONTE: O autor (2020).

Para o isolamento dos patógenos provenientes das flores, foi adotada a técnica de detecção de infecções latentes de *Colletotrichum* spp. conforme descrito por Mertely e Legard (2004) para morangueiro. As flores coletadas foram armazenadas em caixas gerbox® (11 x 11 x 3,5 cm), com papel filtro umedecido com água esterilizada e submetidas à temperatura de -20°C (freezer convencional), por uma hora (FIGURA 2 A). Em seguida, foram transferidas para incubação a 25°C ± 1°C, no escuro e com manutenção de umidade a 100%, por 5 dias. Após esse período, era possível observar, em algumas flores, as estruturas reprodutivas do patógeno envoltos por mucilagem alaranjada (FIGURA 2 B-C). Essas estruturas foram coletadas e transferidas para placas de batata-dextrose-água (BDA, Acumedia®) e incubadas a 25°C ± 1°C, com fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias, foram obtidas as colônias do patógeno presentes em flores de caquizeiro. Para os ramos novos, foram utilizados os métodos de isolamento direto e indireto (FIGURA 2 D). Para o isolamento dos frutos, a parede externa da lesão foi removida (FIGURA 2 E-F); em

seguida, a parte interna necrótica foi coletada e transferida para uma placa de meio de cultura BDA (FIGURA 2 G).

FIGURA 2 - ISOLAMENTO DE *Colletotrichum* spp. DE FLORES, RAMOS NOVOS E FRUTOS MADUROS.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Isolamento de *Colletotrichum* em flores (A-C); isolamento em ramos do ano sintomáticos (D); isolamento de frutos (E-F); e (G) lesão removida e parte interna necrótica, coletada e isolada em meio BDA, à incubação de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após o isolamento, foram obtidas as colônias monospóricas dos isolados. Para isso, 5 mL de água autoclavada esterilizada eram transferidos para cada placa de isolado e, com o auxílio de uma alça de drigalski, foi realizada a raspagem da colônia fúngica para obtenção da suspensão de esporos. Essa suspensão foi filtrada com gaze esterilizado para obtenção de uma suspensão limpa, ou seja, impedindo a passagem de fragmentos do meio de cultura, bem como um amontoado de micélio do fungo, e foi transferida para microtubos de 2 mL. Após isso, foi realizada uma diluição de 10x (450 µl de água autoclavada esterilizada + 50 µl da suspensão de esporo) em novos tubos de *ependorf*. Dessa diluição, 40 µl foram transferidos para placas de ágar-água (AA, Kasvi®) e espalhados com a alça de drigalski. Para a germinação dos esporos, as placas foram mantidas no escuro, por 12 h, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após esse período, as placas foram levadas ao

microscópio e pequenos fragmentos do meio AA, contendo um esporo germinado, foram removidos e transferidos para novas placas de BDA, e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h, obtendo-se, dessa forma, as colônias monospóricas.

Os isolados foram armazenados na coleção fitopatológica do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID), na Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, com o código de referência para a cultura do caqui (LEMID Dk). A preservação dos isolados foi realizada pelo método de papel filtro, com sílica gel, e eles foram armazenados em temperatura de -20°C (SINCLAIR; DHINGRA, 1995).

2.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS

A seleção dos isolados foi realizada a partir da amostra inicial de 57 isolados referentes à primeira coleta da safra 2017/18. Destes, foram selecionados 18 isolados de ramos e de flores para caracterização molecular, que, por sua vez, tiveram 13 isolados utilizados para as caracterizações morfológicas, fisiológicas e patogênicas. A escolha dos isolados da primeira coleta de flores e ramos foi para dar sequência a trabalhos já realizados (MAY DE MIO et al., 2015; DOLINSKI; GORAYEB; MAY DE MIO, 2015), com o intuito de investigar essas partes vegetais, que podem servir como fonte de inóculo primário para epidemias. Para a seleção prévia dos isolados, foi adotado o método tradicional de coloração das colônias e os isolados foram separados em três grupos, sendo: **grupo A**, os isolados que apresentavam semelhanças com o padrão *C. horii* – micélios cotonosos, densos, de coloração cinza a cinza escuro, com bordas regulares, e o reverso da colônia com coloração cinza escuro a marrom escuro, com zona concêntrica; **grupo B**, isolados com micélios brancos, tornando cinza a cinza escuro no verso, e cinza claro para escuro no reverso e; **grupo C**, isolados com micélios cinza no verso e cor-de-rosa a levemente laranja no reverso. Na Tabela 1, estão descritos os isolados selecionados para este capítulo.

TABELA 1 - ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., DA SAFRA 2017/18, UTILIZADOS NESSE TRABALHO, DE ACORDO COM CÓDIGO (LEMID), CULTIVAR, ÓRGÃO VEGETAL, LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA (MESORREGIÃO, ESTADOS), SISTEMA DE PRODUÇÃO DE CULTIVO E CLASSIFICAÇÃO VISUAL POR GRUPO DE COR DAS COLÔNIAS

CÓDIGO LEMID ¹	CULTIVAR	ÓRGÃO VEGETAL ISOLADO	MESORREGIÃO/ ESTADO ²	SISTEMA DE PRODUÇÃO	GRUPO DE COR DE COLÔNIA ³
PR 18-01	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico	C
PR 18-02	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico	C
PR 18-03	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico	A
PR 18-04	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico	C
PR 18-06	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico	A
PR 18-07	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico	C
PR 18-10	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico	A
PR 18-05	Kyoto	Ramo novo	RMC/PR	Convencional	A
PR 18-08	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Convencional	A
PR 18-11	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Convencional	C
PR 18-09	Kakimel	Flor	RMC/PR	Orgânico	A
PR 18-52	Fuyu	Fruto maduro	RMC/PR	Convencional	B
SP 18-05	Fuyu	Ramo novo	RI/SP	Convencional	B
SP 18-01	Fuyu	Ramo novo	RI/SP	Convencional	A
SP 18-02	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional	B
SP 18-03	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional	B
SP 18-04	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional	B
SP 18-06	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional	B

FONTE: O autor (2020).

- ¹ Todos os isolados foram utilizados para caracterização molecular de três regiões genômicas (ITS, GAPDH e TUB2). Os isolados em negrito (n = 13) foram selecionados para caracterizações morfológicas, fisiológicas e patogênicas.
- ² Sigla das mesorregiões: RMC = Região Metropolitana de Curitiba e RI = Região de Itapetininga. Sigla dos estados do Paraná (PR) e São Paulo (SP).
- ³ Grupo A - produziram micélios cotonosos, densos, de coloração cinza a cinza escuro, com bordas regulares, e o reverso da colônia com coloração cinza escuro a marrom escuro, com zona concêntrica; Grupo B - micélios brancos, tornando cinza a cinza escuro, e cinza claro para escuro no reverso e; Grupo C - micélios branco a cinza escuro e cor-de-rosa a levemente laranja no reverso.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

2.3.1 Extração de DNA

Para ambos os métodos de extrações que serão descritos a seguir, os isolados monospóricos foram crescidos em meio BDA e incubados em 25°C, com fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. A extração do DNA foi realizada de duas formas. Primeiro, 200 mg de micélio foram coletadas da margem da colônia do fungo para a realização da extração com o protocolo do kit FastDNA® e os instrumentos FastPrep® (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). O DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fischer Scientific Inc.) e ajustado para concentrações entre 5 a 10 ng µl⁻¹. O DNA diluído foi armazenado com a

refrigeração de -20°C. Esse método foi utilizado para extração dos 18 isolados referentes à primeira coleta da safra 2017/18.

Em segunda etapa, 213 isolados monospóricos foram extraídos pelo método de Dellaporta, Wood e Hicks (1983), com modificações realizadas por Pereira et al. (2019). 100 mg de micélio foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e adicionados 400 µL de extração *buffer* (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl, 1% PVP, 2% β-mercaptoetanol). Os tubos foram aquecidos em 65°C, por 30 min, com agitação manual aos 15 min. Em seguida, foram para centrifugação, com rotação de 3000 rpm, por 5 minutos. Foram coletados 400 µL de sobrenadante e transferidos para novos microtubos de 2 mL, contendo 400 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1). Os tubos foram manualmente agitados até a obtenção de uma emulsão e dispostos para centrifugação de 13500 rpm, por 5 min. Na fase superior, contendo o DNA, foram coletados 200 µL e transferidos para outros microtubos de 1,5 mL, contendo 120 µL de isopropanol. Os microtubos foram agitados manualmente e armazenados em freezer com -20°C, por 30 min, e centrifugados a 13500 rpm, por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de álcool 70% foi adicionado. Novamente, os microtubos foram agitados manualmente e centrifugados a 13500 rpm, por 10 min. O sobrenadante formado foi descartado e o *pellet* de DNA, formado no fundo do microtubo, foi mantido em temperatura ambiente, por 5 horas. Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 100 µL de água *Milli-Q* e os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados em freezer com -20°C.

2.3.2 Identificação por PCR

Para identificação molecular pela técnica de PCR, foi utilizado o *primer* universal ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990) em conjunto com os *primers* específicos *CaInt2* (5' – GGGGAAGCCTCTCGCGG – 3'), para o complexo *C. acutatum* (SREENIVASAPRASAD et al., 1996) e *CgInt* (5' – GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG – 3') e para o complexo *C. gloeosporioides* (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992), amplificando fragmentos de 490 e 450 pares de base, respectivamente.

Um dos fatores para a escolha desse método de identificação molecular para a coleção dos isolados foi a rapidez para se verificar a frequência desses complexos de espécies de *Colletotrichum* nos estados do Sul e Sudeste do Brasil.

As reações de PCR foram preparadas com 12,5 µL de solução, contendo 3,75 µL de água estéril DNA *nuclease-free*, 1,5 µL de DNA extraídos e quantificados na concentração 10 ng µL⁻¹, 6,25 µL de GoTaq® G2 Colorless Master Mix (Promega®) e 0,5 µL de cada um dos *primers*.

As amplificações foram realizadas em termociclador Amplitherm®, seguindo o protocolo de Freeman et al. (2000) para *CaInt2/ITS4*, com uma desnaturação inicial por um período de 2 min, em 95°C, seguida por 35 ciclos de 1 min, em 95°C; 1 min, em 60°C; 1,5 min, em 72°C; e com uma extensão final de 5 min, em 72°C. Para o *CgInt/ITS4*, foi seguido o protocolo de Quirós, Peres e Arau (2013), com uma desnaturação inicial de 5 min, em 94°C, seguida de 26 ciclos com 1 min, em 94°C; 2 min, em 60°C; 2 min, em 72°C; e com uma extensão final de 10 min, em 72°C. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,5%, com tampão 0,5 × TBE *buffer* (44,5 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0), a 90 V, por 1 h e juntamente com o marcador de peso molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen®). Para identificação dos isolados, em cada amplificação, foi utilizado um controle positivo e negativo, representantes de cada complexo *Colletotrichum*, ou seja, para as reações do *CgInt*, houve a presença de um isolado previamente identificado para esse complexo do *C. gloeosporioides*, sendo este o controle positivo, e um outro isolado, identificado como *C. acutatum*, representando o controle negativo. Isso seguiu para as reações de *CaInt2*, porém o que foi negativo para o *CgInt* tornou-se positivo e, assim, sucessivamente. Os produtos das reações da PCR foram separados por eletroforese, em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5x, a 90 V, por uma hora. As bandas de amplificação foram coradas com GelRed (Invitrogen®) e foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen®). Em seguida, as bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta e fotodocumentadas.

2.3.3 Identificação por sequenciamento

Os 18 isolados da seleção inicial da primeira safra de coleta foram identificados a partir do sequenciamento de três regiões genômicas, seguindo-se os critérios dos trabalhos de reclassificação filogenética para os complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (DAMM et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Foi amplificada a região do ITS-rDNA (ITS 1 e ITS 4) [615 pb] e os genes parciais GAPDH (GDF1 e GDR1) [308 pb] e TUB2 (T1 e Bt2b) [716 pb], com os seus respectivos *primers* (TABELA 2). As reações de PCR foram realizadas no termociclador Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific Inc.), com total de 25 µL. As misturas das reações foram realizadas da seguinte forma: 17 µL de água estéril (DNA *nuclease free*), 0,5 µL de *primer Forward*, 0,5 µL de *primer Reverse*, 2 µL de DNA genômico diluído, ajustado para 5 µL de AccuPower® PCR Mix (com UDG) (Bionner). A condição de PCR para a região do ITS consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 4 min, em 95°C, seguida de 35 ciclos de 30 s, em 95°C; 30 s, em 52°C; 30 s, em 72°C; e uma etapa de desnaturação final de 7 min, em 72°C. Para os outros genes parciais, as etapas de PCR foram as mesmas, porém as temperaturas de anelamento se diferenciaram: GAPDH (60°C) e TUB2 (55°C).

TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS NESTE ESTUDO, COM AS SEQUÊNCIAS E REFERÊNCIAS

GENE ¹	PRIMER	DIREÇÃO	SEQUÊNCIA (5'-3')	REFERÊNCIAS
ITS	ITS-1F	Forward	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes e Bruns (1993)
	ITS-4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. (1990)
GAPDH	GDF1	Forward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton et al. (1992)
	GDR1	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	Templeton et al. (1992)
TUB2	T1	Forward	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell e Cigelnik (1997)
	Bt2b	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass e Donaldson (1995)

FONTE: O autor (2020).

¹ ITS = *internal transcribed spacer*; GAPDH = *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; TUB2 = β -*tubulin* 2.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,5%. Na sequência, os resultados dos produtos PCR foram purificados com ExoSAP-IT Product Cleanup (Affymetrix®), seguindo-se as recomendações do fabricante, e enviados para o serviço de sequenciamento da Universidade da Califórnia de Davis (DNA Sequencing Facility, Davis CA). As sequências de DNA foram obtidas para ambas as direções dos primers, utilizando-se o ABI Prism® DNA Sequencing Analysis Software v. 5.2, com a composição química BigDye® Terminator v. 3.1.

As sequências de DNA (*forward* e *reverse*) de cada isolado/gene obtidas foram avaliadas quanto à qualidade de sequenciamento, com base nos respectivos eletroferogramas, e editadas com o auxílio do software Vector NTI Advance® 11 (Thermo Fischer Scientific), gerando, no final, as sequências consenso.

As sequências consenso geradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLASTn, para confirmação prévia das espécies de *Colletotrichum* de cada um dos isolados.

2.3.4 Análise filogenética

Após a análise no BLASTn, as sequências consenso foram alinhadas para cada complexo de espécie de *Colletotrichum*, utilizando-se o software T-Coffee *alignment* (NOTREDAME; HIGGINGS; HERINGA, 2000), e editadas manualmente, quando necessário. Para o complexo *C. acutatum*, 75 sequências de isolados foram obtidas, alinhadas e concatenadas com TreeBASE (www.treebase.org/treebase-web/home.html), que foram provenientes dos trabalhos de Damm et al. (2012), Velho et al. (2015) e Bragança et al. (2016), e o *C. orchidophilum* foi usado como o *outgroup* desse complexo. Para o complexo *C. gloeosporioides*, 48 sequências foram obtidas do trabalho de Weir, Johnston e Damm (2012) e o *C. boninense* foi usado como *outgroup*. Posteriormente, no programa MEGA v.7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), foram adicionadas as sequências consenso geradas deste estudo e alinhadas manualmente com aquelas obtidas do TreeBASE. A análise multigênica foi realizada por complexo de espécies de *Colletotrichum*.

A reconstrução da árvore filogenética foi gerada por meio do algoritmo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), com probabilidade posterior Bayesiana (BPP), utilizando o software MrBayes v. 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Para a cadeia MCMC, as sequências foram combinadas simultaneamente com a análise inicial de 10.000.000 de gerações de árvores aleatórias, sendo as árvores amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras árvores foram descartadas da análise (*burn-in* de 25%) para eliminação do efeito inicial do processo iterativo e os valores da BPP foram determinados da árvore consenso por meio das 7.500 árvores remanescentes. O parâmetro de aquecimento foi de 0,2 e as análises foram finalizadas

quando o desvio padrão médio das frequências divididas estava abaixo de 0,01. Os modelos evolutivos de substituição dos nucleotídeos foram estimados com o programa JModelTest 2 v. 2.1.10 (DARRIBA et al., 2012). Os modelos foram estimados separadamente para cada região genômica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC).

Os resultados das árvores filogenéticas foram visualizados com o programa FigTree v. 1.4.3 (www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) e exportados para edição em programa gráfico (www.inkscape.org/). Todas as sequências derivadas deste estudo foram depositadas no banco de dados do GenBank e, em seguida, foram obtidos os seus respectivos códigos de acesso.

2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os 13 isolados selecionados do Quadro 1 foram avaliados quanto às características culturais das colônias (cor e textura) após o sétimo dia de crescimento, em incubação a 25°C, em meio BDA, com fotoperíodo de 12 horas.

Para a morfologia dos conídios, no décimo dia, foram obtidas as suspensões de conídios em 5 mL de água destilada autoclavada e essas suspensões foram transferidas para erlenmeyers autoclavados de 50 mL. Com um hemocitômetro, essa suspensão foi ajustada para a concentração de 10^5 conídios mL^{-1} . Posteriormente, 30 μL (2 gotas de 15 μL) foram transferidos para uma lâmina, em um microscópio Leica DFC450 (Leica microsystems), com o aumento de 40X. Foram medidos as dimensões e formatos de 100 conídios por isolado, com o auxílio do programa Piximètre v. 5.10 (<http://ach.log.free.fr/Piximetre/>).

As dimensões dos conídios foram determinadas por meio das medições do comprimento e largura e o volume foi calculado (considerando os conídios com estruturas cilíndricas) pela equação $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$, proposta por López-Moral et al. (2017), onde r = comprimento do conídio/2 e h = largura do conídio. De acordo com a forma, os conídios foram classificados em três categorias: cilíndrico, fusiforme e clavado, segundo Sutton (1980) e Cox e Irwin (1988) e adaptado por Tozze-Júnior (2007). Para a análise estatística, as variáveis comprimento, largura e volume foram comparadas pela análise de variância (ANOVA). A inspeção visual para os

pressupostos do modelo, incluindo resíduos e plotagem PP, foi conduzida e as transformações dos dados foram aplicadas pelas interpretações gráficas, de acordo com Box e Cox (1964). Os valores das médias foram comparados pelo teste LSD, de Fisher, em $P = 0,05$ (STEEL; TORRIE, 1985).

Para a formação do apressório, foram preparadas placas de AA (2%), as quais foram vertidas na tampa (para manutenção da umidade) e no fundo da placa de polietileno. A solução de conídios dos 13 isolados foi ajustada para 10^5 conídios mL^{-1} . Em seguida, três lamínulas foram dispostas equidistantes, nos fundos das placas de cada isolado, e foram transferidos 10 μL da suspensão de conídios. Após essa etapa, as placas foram fechadas e incubadas a 25°C , por 24 horas, no escuro. Posteriormente, foi avaliada a taxa de formação de apressórios melanizados em uma área de, aproximadamente, 1 mm^2 . Foram estimados 100 apressórios por isolado. Também foi avaliada a morfologia dos apressórios conforme Sutton (1980) e Cox e Irwin (1988), sendo descritos três tipos predominantes: lobado, levemente lobado e arredondado.

O modelo linear generalizado (GLM) foi aplicado para previsão da taxa de formação dos apressórios melanizados, utilizando-se o ajuste quase-binomial (logit). ANOVA foi estimada para a análise da significância e as médias entre os isolados foram comparadas pelo teste F, sendo significativo para inferência $F < 0,05$.

2.5 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA (*IN VITRO*)

2.5.1 Efeito da temperatura ótima no crescimento micelial

Discos de micélios ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) foram obtidos das margens das colônias de 7 dias de crescimento ativo, em BDA, dos mesmos 13 isolados citados anteriormente. Esses discos de micélio foram transferidos, cuidadosamente, para o centro da placa e foram incubados nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C , no escuro. Durante 7 dias de incubação, diariamente, duas medidas perpendiculares foram estimadas para o diâmetro das colônias (mm/dia), com o auxílio de um paquímetro digital. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado segundo a fórmula proposta por Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

Onde:

IVCM = Índice de Velocidade do Crescimento Micelial;

D = Diâmetro médio atual;

Da = Diâmetro médio do dia anterior;

N = Número de dias após a inoculação.

Os isolados foram dispostos aleatoriamente, em cada temperatura, consistindo 3 placas (repetições) x isolado x temperatura. O experimento foi repetido três vezes e as temperaturas das incubadoras foram também aleatoriamente alteradas entre os experimentos, para minimizar esse efeito na análise. Para evitar uma avaliação exaustiva dos dados, o experimento foi dividido em duas partes: primeiramente, foram avaliados 7 isolados e, em seguida, os outros 6 isolados restantes.

2.5.2 Efeito da temperatura ótima na germinação de conídios

A temperatura ótima de germinação de conídios foi avaliada para as mesmas temperaturas mencionadas acima (item 2.5.1). Para esse ensaio, foram preparadas suspensões de 1×10^4 conídios ml^{-1} e alíquotas de 40 μl foram transferidas para três placas de ágar-água (2% AA), para cada isolado/temperatura, sendo consideradas as placas como repetições. Após 12 h de incubação, foram avaliados cerca de 50 conídios x repetição/isolados x temperatura. A proporção de conídios germinados foi utilizada para calcular a temperatura ideal. Os conídios germinados foram considerados quando o tubo germinativo tinha o dobro da dimensão do conídio. O experimento foi repetido duas vezes.

2.5.3 Análise estatística

Os experimentos foram delineados em esquema fatorial 7 x 13, para temperatura ótima de crescimento micelial e germinação, sendo 7 temperaturas e 13 isolados, respectivamente.

Para o ensaio de crescimento micelial, foram calculadas as áreas abaixo da curva de crescimento (AACC) para cada unidade amostral, nesse caso, as placas de

petri, com meio BDA. A AACC é proporcional ao crescimento médio das colônias (mm) ao longo do tempo do experimento (sete dias), medidos diariamente. Nesse cálculo, também foi levada em consideração a variância do erro entre as repetições (replicadas) dentro das condições de instalação do experimento que podem ocorrer. Após isso, foi feita a agregação ao nível de repetição experimental, na qual foi considerada a média das unidades amostrais de cada experimento. As temperaturas extremas foram removidas por não apresentarem crescimento, e isso poderia subestimar a variância residual com impacto no comprimento dos intervalos de confiança e interferir na estimativa da temperatura ótima, que está entre os intervalos de temperatura estudados.

As curvas de crescimento foram ajustadas com o polinômio de grau três, em função da temperatura, para estimativa do ponto crítico ao nível de isolados, ou seja, determinada a temperatura de crescimento mais acelerado para cada isolado. Após isso, foi determinado o ponto crítico por espécie. Para a construção das curvas de temperatura ótima do crescimento micelial, foi verificada a possibilidade de comparar curvas dos isolados dentro de cada espécie de *Colletotrichum*. Para isso, foram combinados dois isolados de cada espécie e adotado o mesmo rótulo/código para eles, resultando em 12 níveis de isolados (condição sob a hipótese nula de igualdade) e não mais 13 (condição sob a hipótese alternativa). A comparação desses modelos foi testada por meio do teste de hipótese de igualdade das curvas entre os isolados que foram combinados.

Quando se concluiu não haver diferença na curva de dois isolados dentro de cada espécie, isso implicou não haver diferença na temperatura de crescimento ótimo. Por exemplo, as diferenças nas curvas podem ser causadas pelo intercepto (diferença do valor-P), mas ele não interfere na estimativa do ponto de ótimo crescimento por ser uma constante em relação à temperatura, pois esse valor vai desaparecer quando se derivar a função na solução analítica, pelo ponto de crescimento ideal. Dessa forma, o teste de igualdade realizado neste ensaio considerou a igualdade da curva em relação aos parâmetros (com k elementos) dos modelos a e b , sem incluir o intercepto (β_0):

$$H_0: [\beta_{a1}, \dots, \beta_{ak}] T = [\beta_{b1}, \dots, \beta_{bk}] T, H_0: [\beta_{a1}, \dots, \beta_{ak}] T = [\beta_{b1}, \dots, \beta_{bk}] T.$$

O teste de igualdade foi usado para os parâmetros da forma da curva de crescimento, sendo excluído o parâmetro de posição (intercepto). A tabela com o resultado desse teste de hipótese de igualdade entre os vetores de parâmetros das curvas entre os pares de isolados (A e B), dentro de cada espécie, pode ser analisada no Apêndice deste trabalho. Essa tabela também contém a análise estatística de F correspondente da mudança na soma dos quadrados, provocada pela combinação de dois isolados, passando de 13 para 12 níveis. Além disso, como o modelo utilizado foi o polinômio de 3º grau, ao testar que dois isolados possuem a mesma forma da curva de crescimento, reduz três parâmetros do modelo livre (NumDF) e são apresentados os valores de valor-P, ordenados pela combinação de isolados por espécie.

Os mesmos critérios foram adotados para a construção das curvas de crescimento ótimo para a germinação de conídios, porém as estimativas foram criadas a partir da proporção de conídios germinados em um total de 50 avaliados para cada repetição de isolados/temperatura.

2.6 TESTES DE PATOGENICIDADE

Para o teste de patogenicidade, isolados foram inoculados pela metodologia *ex vivo*, em ramos novos, folhas, sépalas e frutos destacados, e pela metodologia *in vivo*, em ramos novos das plantas de caquizeiro. Além disso, foi realizado o teste de patogenicidade cruzada em folhas e frutos destacados de diversas espécies.

Para a patogenicidade *ex vivo*, ramos novos, folhas, flores (sépalas) e frutos maduros, sadios, sem ferimentos, da 'Fuyu', foram inoculados. Frutos e ramos foram desinfestados durante 1 min, em álcool 70%, seguido de mais 1 min, em hipoclorito de sódio, em solução de 0,5%, e enxaguados três vezes, em água destilada, enquanto, para as folhas e sépalas, o tempo de exposição ao álcool e hipoclorito de sódio foi reduzido para 20 s, para não afetar as estruturas da parede vegetal desses órgãos. Em seguida, esses órgãos vegetais foram dispostos em bandejas, previamente desinfestadas com álcool 70%, e mantidos em temperatura ambiente para secagem. Esses testes serão detalhados a seguir.

2.6.1 Patogenicidade em tecidos vegetais destacados de caqui (*ex vivo*)

Na patogenicidade em frutos, estes foram dispostos em recipientes plásticos de 350 mL, com água destilada autoclavada no fundo, para manutenção da umidade relativa. Os frutos ficaram elevados em copos plásticos de 50 mL, para evitar o contato direto com a água. A inoculação foi conduzida com os 13 isolados selecionados e foram testados em frutos com e sem ferimento, pelo método de inoculação por suspensão de conídios. Os ferimentos foram realizados com palito de dente autoclavado, sendo realizada uma perfuração superficial leve na parte longitudinal dos frutos. Para a inoculação, foram utilizadas colônias com 7 dias de crescimento, em meio BDA, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Para a obtenção da suspensão de esporos, 5 mL de água destilada, autoclavada com tween (20%), foram transferidos para as placas, em seguida, com hemocitômetro, as concentrações foram ajustadas para 1×10^4 conídios mL^{-1} e 40 μL dessa suspensão foram inoculados para os frutos. No total, foram utilizados 140 frutos, sendo 10 frutos por isolado e mais uma testemunha (inoculado com água). Cinco frutos foram inoculados com ferimento e cinco frutos inoculados sem ferimento. O experimento foi conduzido duas vezes.

Após esse ensaio nos frutos, quatro isolados foram selecionados para a condução dos demais experimentos em frutos com inoculação por discos de micélios, folhas, sépalas e ramos novos, sendo um isolado de *C. horii* (LEMIDPRDk 18-06), um de *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-06), um de *C. nymphaeae* (LEMIDPRDk 18-01) e um de *C. melonis* (LEMIDPRDk 18-11), que foram previamente identificados e que apresentaram maiores agressividades no ensaio com frutos sem ferimento.

Na patogenicidade em folhas, estas foram dispostas em caixas gerbox, sendo sustentadas por grades de alumínio e preenchidas com água autoclavada, no fundo dessas caixas. A inoculação foi realizada pelo método de suspensão de conídios (1×10^4 conídios mL^{-1}), seguindo a mesma metodologia descrita para a patogenicidade em frutos. O experimento conteve 14 folhas por isolado e mais uma testemunha, sendo 7 com ferimento e 7 sem ferimento, totalizando 70 folhas. O experimento foi conduzido duas vezes.

Para os ensaios com discos de micélios, foram removidos discos de 4 mm de diâmetro das margens das colônias de 7 dias de crescimento, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. E, para todos os experimentos, foi avaliado um controle, no qual eles foram inoculados com discos (de mesmo diâmetro usado na inoculação dos

patógenos) de ágar-água. Nesse ensaio, foram utilizados 30 frutos por isolado e uma testemunha, sendo 15 com ferimento e 15 sem ferimento, totalizando 120 frutos. O experimento foi repetido duas vezes.

Nesses ensaios com frutos e folhas, a avaliação foi realizada diariamente, durante 10 dias, na qual foram mensurados o período de incubação (PI), o período de latência (PL) e os diâmetros (mm) das lesões por meio de duas medidas perpendiculares. Os diâmetros médios das lesões foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA). Após a inspeção visual dos pressupostos do modelo, foi observada a necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada, devido à interpretação gráfica sugerida de λ log-likelihood, conforme descrito por Box e Cox (1964). As médias das lesões foram comparadas por meio do teste de *least significant difference* (LSD), com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o software R (version 3.6.1).

Na patogenicidade em ramos novos e sépalas, o método utilizado para inoculação foi o de disco de micélio (\varnothing 4 mm), seguindo a metodologia descrita para os frutos. Para a patogenicidade em ramos novos, estes foram coletados na fase de floração da planta de caquizeiro (meados de outubro a novembro de 2019) e foram obtidos segmentos de ramos com 15 cm de comprimento para padronização da inoculação. Esses ramos foram dispostos em recipientes plásticos, com grades de alumínio, para a sustentação e a manutenção da umidade foi realizada com a transferência de água destilada no fundo desses recipientes. No segmento do ramo, 4 pontos de inoculação equidistantes foram adotados e considerados como as repetições do experimento. Foram utilizados 6 segmentos de ramos por isolado e para testemunha, sendo 3 ramos inoculados com ferimento e 3 sem ferimento, totalizando 12 repetições para cada método. Os ferimentos foram realizados por meio de leve corte superficial da epiderme dos ramos, nos pontos definidos para inoculação, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, previamente flambada.

Para ensaio de patogenicidade em sépalas, a montagem do experimento foi similar à descrita para os ramos. Para a inoculação, as flores foram coletadas na fase de completa abertura floral. Ao todo, 30 flores (sépalas) foram coletadas para cada isolado e testemunha, sendo 15 inoculadas com ferimento e 15 sem ferimento, totalizando 150 flores. Os ferimentos nas sépalas foram realizados por raspagem superficial do tecido, com palito de dente autoclavado.

Os experimentos foram repetidos duas vezes. Ao final do 15º dia de experimento, foi avaliada a frequência (%) da incidência da doença, atribuindo a nota igual a um (1) para pontos de inoculação com incidência e a nota igual a zero (0) quando não houve a incidência da doença.

Após os experimentos, alguns frutos, folhas, flores e ramos infectados foram separados por isolado e realizado o seu reisolamento de forma indireta e direta. Posteriormente, foram transferidos para placas com BDA e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. E, logo após esse período, foi realizada a comparação das características culturais das colônias com as utilizadas no momento da inoculação.

2.6.2 Patogenicidade cruzada (*ex vivo*)

Para a patogenicidade cruzada, foram coletados folhas e frutos maduros de caquizeiro (cv. Fuyu), macieira (cv. Gala) e pereira (cv. Williams). Os procedimentos de desinfestação dos frutos foram realizados como descrito anteriormente. O experimento foi conduzido com fermento nos frutos e sem fermento para as folhas. O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito no item acima, para o método de suspensão de conídios (1×10^4 conídios mL^{-1}). A inoculação foi realizada com três isolados de caquizeiro, sendo um representante da espécie *C. horii* (LEMIDPRDk 18-06), um de *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-06) e um de *C. nymphaeae* (LEMIDPRDk 18-01); dois isolados de macieira, sendo um de *C. fructicola* (Col 33) e um de *C. nymphaeae* (Col 15); e um isolado de *C. nymphaeae* (PpCnPR17-02) de pereira.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com esquema fatorial 3 x 6, sendo 3 culturas e 6 isolados, com 10 repetições por combinação entre cultura e isolado. Foi determinada, diariamente, a incidência da doença, sendo, no final, estimados os PI e PL, bem como o diâmetro das lesões (para os frutos). Os valores médios dos diâmetros das lesões foram comparados pela ANOVA, pelo teste de médias LSD, com nível de significância (α) de 5%. Para os testes de médias das lesões em frutos de caquizeiro, não houve a necessidade da transformação dos dados, enquanto, para as análises em frutos de maçã e pera, os dados foram transformados para raiz quadrada, devido à interpretação gráfica sugerida de λ log-likelihood, proposto por Box e Cox (1964). As análises foram realizadas com o

suporte do software R (version 3.6.1). No final dos experimentos, foi realizado o reisolamento de alguns tecidos.

2.6.3 Patogenicidade comparativa de isolados obtidos de diferentes frutíferas em ramos do ano (novos), em plantas de caquizeiro (*in vivo*)

Os isolados das diferentes culturas, descritos no item anterior (2.6.2), foram também avaliados quanto ao potencial de causar doença em plantas de caquizeiro (metodologia *in vivo*). Foram selecionadas quatro plantas de caquizeiro cv. Fuyu, que estão localizadas em uma área experimental orgânica do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba. A identificação das plantas foi conduzida de forma aleatória na área e a demarcação dos isolados foi realizada com diferentes cores de fita de cetim. Em cada planta, foram selecionados 7 ramos velhos equidistantes (sendo 6 ramos para inoculação dos patógenos e um ramo para a testemunha), que continham três ramificações com ramos novos próximos ao ápice. Essas ramificações foram consideradas as sub-repetições e a planta de caqui foi considerada a repetição do experimento. As inoculações e avaliações foram realizadas nesses ramos considerados como sub-repetições, totalizando 12 ramos (4 plantas x 3 ramificações por isolado e testemunha).

Para o preparo do inóculo, foram obtidas suspensões de 1×10^4 conídios mL^{-1} de colônias crescidas em meio BDA, por 7 dias, à incubação de 25°C, com fotoperíodo de 12 h. Para cada isolado/espécie, foi preparada uma suspensão de esporos com volume total de 240 mL, para ser aplicada na inoculação. Desse volume, 50 mL aproximadamente foram inoculados com um esborrifador, nos ramos selecionados (sub-repetições), em cada planta. Para a testemunha, os ramos foram tratados com água. Após a inoculação, sacos plásticos foram fixados em cada ramo inoculado para manutenção da umidade relativa do ar e, após 24 horas, esses sacos foram removidos.

O experimento foi conduzido do florescimento até o início da frutificação, compreendendo do final do mês de outubro/2019 ao início de janeiro/2020, porém as plantas não contavam com frutos, fato esse decorrente da poda drástica realizada nos ramos de condução para renovação do pomar, no ciclo anterior. No ciclo atual da planta, foram emitidos novos ramos por aqueles que tinham sido podados, sendo

esses novos considerados para inoculação/avaliação do experimento. O experimento foi conduzido por 66 dias, com avaliações da incidência da doença (sintomas) nos ramos a cada 5 dias, sendo estimado, no final, o período de incubação para cada isolado. Para a confirmação da patogenicidade, alguns tecidos vegetais infectados foram coletados e dispostos em câmara úmida e, posteriormente, foram avaliados os sinais dos patógenos em microscópio e realizado o reisolamento em placas de BDA.

O período de incubação foi estimado com os dados da incidência da doença, pelo método de Kaplan-Meier, para verificação da probabilidade de sobrevivência dos ramos aos patógenos durante o tempo de experimento. A comparação das curvas entre os tratamentos foi estimada pelo teste não paramétrico de *log-rank* (KAPLAN; MEIER, 1958).

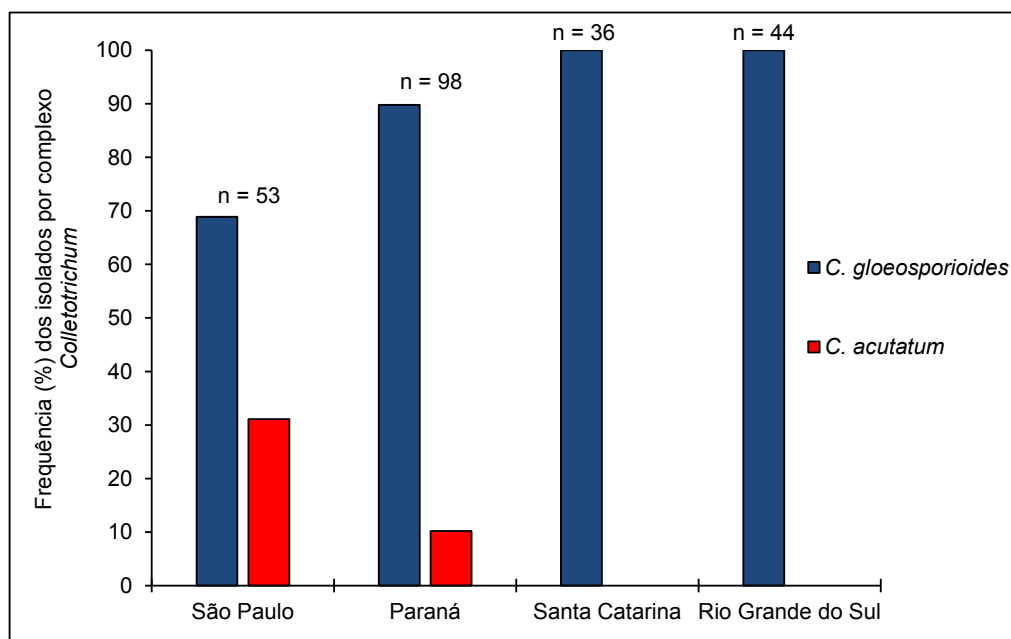
3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.1.1 Identificação por PCR

Os isolados de São Paulo e Paraná foram identificados como pertencentes aos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Por outro lado, apenas o complexo *C. gloeosporioides* foi identificado nas amostras coletadas em Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FIGURA 3).

FIGURA 3 - FREQUÊNCIA (%) DOS ISOLADOS POR COMPLEXO DE *Colletotrichum* EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE COLETA (n) DOS ISOLADOS POR ESTADO DE PRODUÇÃO NACIONAL, POR MEIO DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR PCR, UTILIZANDO OS *PRIMERS* ESPECÍFICOS



FONTE: O autor (2020).

NOTA: *Primers* específicos: CgInt para o complexo *C. gloeosporioides* e Calnt2 para o complexo *C. acutatum*.

3.1.2 Identificação por sequenciamento

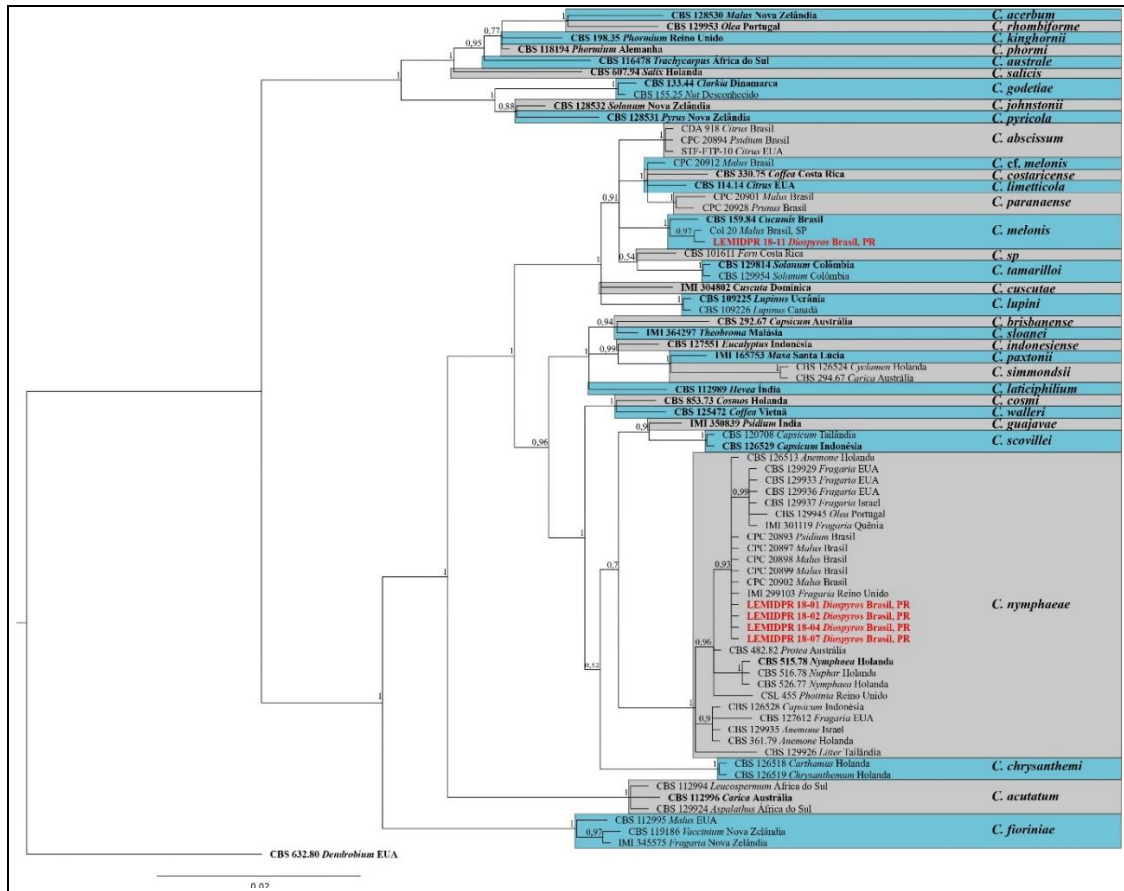
O resultado da eletroforese em gel indicou, para a região ITS-rDNA e os genes parciais GAPDH e TUB2 dos 18 isolados selecionados, amplificação de

aproximadamente 550, 250 e 700 pares de bases (pb), respectivamente. Após a análise prévia das sequências consenso pela ferramenta BLASTn, foi identificada a presença dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* na amostra dos isolados.

Para o complexo *C. acutatum*, foram obtidas 75 sequências de DNA de diferentes espécies para construção do alinhamento multigênico, gerando fragmento de 1009 pb. Nesse alinhamento, estão inclusos os isolados deste estudo ($n = 5$), bem como a sequência de *C. orchidophilum*, que serviu como *outgroup* (TABELA 3). Os comprimentos dos fragmentos gênicos foram: GAPDH: 1-201, ITS: 202-633, TUB2: 634-1009. Para a análise de IB, foram estimados os modelos evolutivos para cada alinhamento gênico, com base no Critério de Informação de Akaike (AIC), sendo o modelo HKY + G para GAPDH, GTR + I + G para ITS e GTR + G para TUB2. A árvore filogenética multigênica, gerada com os valores de suporte das probabilidades posterior Bayesiana (BPP), está sendo apresentada à esquerda dos nós (FIGURA 4).

Os isolados LEMIDPRDk 18-01, LEMIDPRDk 18-02, LEMIDPRDk 18-04 e LEMIDPRDk 18-07, provenientes deste estudo, se agruparam no clado de *C. nymphaeae*, com valor de BPP igual a 1,0. O isolado LEMIDPRDk 18-11 também teve bom suporte de BPP (igual 1,0) no clado da espécie *C. melonis* (FIGURA 4). Portanto, essas duas espécies foram identificadas como agentes causais da antracnose do caquizeiro no Brasil.

FIGURA 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE 75 ISOLADOS DO COMPLEXO *C. acutatum*, INCLUINDO O *OUTGROUP*, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA (IB), COM A CONCATENAÇÃO DA REGIÃO ITS-rDNA E DOS GENES PARCIAIS GAPDH E TUB2.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Os valores da probabilidade posterior Bayesiana (BPP) estão sendo mostrados à esquerda dos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão em negrito vermelho e, em preto, estão os isolados *ex-type*. O isolado *C. orchidophilum* CBS 632.80 está sendo utilizado como o *outgroup*. A barra de escala de 0,02 indica o número de alterações de nucleotídeos.

As sequências geradas de cada um dos isolados deste estudo foram depositadas no GenBank, com os respectivos códigos de acesso (TABELA 3).

TABELA 3 - ESPÉCIES DO COMPLEXO *C. acutatum* UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK

continua

ESPÉCIES	NÚMERO DE ACESSO ¹	HOSPEDEIRO	PAÍS/ESTADO	NÚMERO GENBANK		
				ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. abscissum</i>	COAD 1877, CDA 918 ² CPC 20894, CBS 134727 IMI 504890, STF-FTP-10	<i>Citrus x sinensis</i> <i>Psidium guajava</i> <i>Citrus x sinensis</i>	Brasil, São Paulo Brasil, Cafelândia EUA, Flórida, Frostproof	KP843126 KC204988 KT153559	KP843132 KC205022 KT153548	KP843135 KC205056 KT153563
<i>C. acerbum</i>	CBS 128530	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	JQ948459	JQ948790	JQ950110
<i>C. acutatum</i>	CBS 112994 CBS 112996 ² CBS 129924	<i>Leucospermum</i> sp. <i>Carica papaya</i> <i>Aspalathus linearis</i>	África do Sul Austrália África do Sul	JQ948361 JQ005776 JQ948375	JQ948692 JQ948677 JQ948706	JQ950012 JQ005860 JQ950026
<i>C. australe</i>	CBS 116478 ²	<i>Trachycarpus fortunei</i>	África do Sul	JQ948455	JQ948786	JQ950106
<i>C. brisbanense</i>	CBS 292.67 ²	<i>Capsicum annum</i>	Austrália	JQ948291	JQ948621	JQ949942
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126518 CBS 126519	<i>Carthamus</i> sp. <i>Chrysanthemum coronarium</i>	Holanda Holanda	JQ948271 JQ948272	JQ948601 JQ948602	JQ949922 JQ950923
<i>C. cosmi</i>	CBS 853.73 ²	<i>Cosmos</i> sp.	Holanda	JQ948274	JQ948604	JQ949925
<i>C. costaricense</i>	CBS 330.75 ²	<i>Coffea arabica</i> , cv. Typica	Costa Rica	JQ948180	JQ948510	JQ949831
<i>C. cuscutae</i>	IMI 304802	<i>Cuscuta</i> sp.	Dominica	JQ948195	JQ948525	JQ949846
<i>C. fioriniae</i>	CBS 112995 CBS 119186 IMI 345575	<i>Malus domestica</i> <i>Vaccinium</i> sp. <i>Fragaria x ananassa</i>	EUA Nova Zelândia Nova Zelândia	JQ948298 JQ948312 JQ948332	JQ948628 JQ948642 JQ948993	JQ949949 JQ949963 JQ949983
<i>C. godetiae</i>	CBS 133.44 CBS 155.25	<i>Clarkia hybrida</i> , cv. Kelvon <i>Nut shell</i>	Dinamarca Unknown	JQ948402 JQ948410	JQ948733 JQ948741	JQ950053 JQ950061
<i>C. guajavae</i>	IMI 350839	<i>Psidium guajava</i>	Índia	JQ948270	JQ948600	JQ949921
<i>C. indonesiense</i>	CBS127551	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonésia	JQ948288	JQ948618	JQ948949
<i>C. johnstonii</i>	CBS 128532	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nova Zelândia	JQ948444	JQ948775	JQ950095
<i>C. kinghornii</i>	CBS 198.35	<i>Phormium</i> sp.	Reino Unido	JQ948454	JQ948785	JQ950105
<i>C. laticipilium</i>	CBS 112989	<i>Hevea brasiliensis</i>	Índia	JQ948289	JQ948619	JQ949940
<i>C. limetticola</i>	CBS 114.14	<i>Citrus aurantifolia</i>	EUA, Flórida	JQ948193	JQ948523	JQ949844
<i>C. lupini</i>	CBS 109225 CBS 109226	<i>Lupinus albus</i> <i>Lupinus albus</i>	Ucrânia Canadá	JQ948155 JQ948158	JQ948485 JQ948488	JQ949806 JQ949809
<i>C. melonis</i>	CBS 159.84 Col 20	<i>Cucumis melo</i> <i>Malus domestica</i>	Brasil Brasil, São Paulo	JQ948194 KC204986	JQ948524 KC205020	JQ949845 KC205054
	LEMIDPRDk 18-11	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MK209080	MK216322	MK216323
<i>C. cf. melonis</i>	CBS 134730, CPC 20912	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Rio Grande do Sul	KC204997	KC205031	KC205065

TABELA 3 - ESPÉCIES DO COMPLEXO *C. acutatum* UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK

ESPÉCIES	NÚMERO DE ACESSO ¹	HOSPEDEIRO	PAÍS/ESTADO	NÚMERO GENBANK		
				ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. nymphaeae</i>	CBS 126513	<i>Anemone</i> sp.	Holanda	JQ948223	JQ948553	JQ949874
	CBS 126528	<i>Capsicum</i> sp.	Indonésia	JQ948219	JQ948549	JQ949870
	CPC 20893	<i>Psidium guajava</i>	Brasil	KC204987	KC205021	KC205055
	CPC 20897	<i>Malus domestica</i>	Brasil	KC204989	KC205023	KC205057
	CPC 20898	<i>Malus domestica</i>	Brasil	KC204990	KC205024	KC205058
	CBS 127612	<i>Fragaria x ananassa</i>	EUA	JQ948230	JQ948560	JQ949881
	CPC 20899	<i>Malus domestica</i>	Brasil	KC204991	KC205025	KC205059
	CBS 129926	<i>Litter</i>	Tailândia	JQ948216	JQ948546	JQ949867
	CPC 20902	<i>Malus domestica</i>	Brasil	KC204993	KC205027	KC205061
	CBS 129929	<i>Fragaria x ananassa</i>	EUA	JQ948229	JQ948559	JQ949880
	CBS 129933	<i>Fragaria x ananassa</i>	EUA	JQ948262	JQ948592	JQ949913
	CBS 129935	<i>Anemone</i> sp.	Israel	JQ948227	JQ948557	JQ949878
	CBS 129936	<i>Fragaria x ananassa</i>	Israel	JQ948252	JQ948582	JQ949903
	CBS 129937	<i>Fragaria x ananassa</i>	Israel	JQ948253	JQ948583	JQ949904
	CBS 129945	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948201	JQ948531	JQ949852
	CBS 361.79	<i>Anemone coronaria</i>	Holanda	JQ948248	JQ948578	JQ949899
	CBS 482.82	<i>Protea</i> sp.	Austrália	JQ948213	JQ948543	JQ949864
	CBS 515.78	<i>Nymphaea alba</i>	Holanda	JQ948197	JQ948527	JQ949848
	CBS 516.78	<i>Nuphar luteum</i>	Holanda	JQ948198	JQ948528	JQ949849
	CBS 526.77	<i>Nymphaea alba</i>	Holanda	JQ948199	JQ948529	JQ949850
	CSL 455	<i>Photinia</i> sp.	Reino Unido	JQ948217	JQ948547	JQ949868
	IMI 299103	<i>Fragaria vesca</i>	Reino Unido	JQ948231	JQ948561	JQ949882
	IMI 301119	<i>Fragaria vesca</i>	Quênia	JQ948266	JQ948596	JQ949917
	LEMIDPRDk 18-1	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MH750229	MH750232	MK209631
	LEMIDPRDk 18-2	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN956518	MN982428	MN982441
	LEMIDPRDk 18-4	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN956519	MN982429	MN982442
	LEMIDPRDk 18-7	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN958847	MN982430	MN982443
<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80 ³	<i>Dendrobium</i> sp.	EUA	JQ948151	JQ948481	JQ949802
<i>C. paranaense</i>	CBS 134729, CPC 20901	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Paraná	KC204992	KC205026	KC205060
	CBS 134728, CPC 20928	<i>Prunus persica</i>	Brasil, Parapanema	KC205002	KC205036	KC205070
<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753	<i>Musa</i> sp.	Santa Lúcia	JQ948285	JQ948615	JQ949936
<i>C. phormii</i>	CBS 118194	<i>Phormium</i> sp.	Alemanha	JQ948446	JQ948777	JQ950097

continua

TABELA 3 - ESPÉCIES DO COMPLEXO *C. acutatum* UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK

ESPÉCIES	NÚMERO DE ACESSO ¹	HOSPEDEIRO	PAÍS/ESTADO	conclusão NÚMERO GENBANK		
				ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. pyricola</i>	CBS 128531	<i>Pyrus communis</i>	Nova Zelândia	JQ948445	JQ948776	JQ950096
<i>C. rhombiforme</i>	CBS 129953	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948457	JQ948788	JQ950108
<i>C. salicis</i>	CBS 607.94	<i>Salix</i> sp.	Holanda	JQ948460	JQ948791	JQ950111
<i>C. scovillei</i>	CBS 120708	<i>Capsicum annum</i>	Tailândia	JQ948269	JQ948599	JQ949920
	CBS 126529	<i>Capsicum</i> sp.	Indonésia	JQ948267	JQ948597	JQ949918
<i>C. simmondsii</i>	CBS 126524	<i>Cyclamen</i> sp.	Holanda	JQ948281	JQ948611	JQ949932
	CBS 294.67	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JQ948277	JQ948607	JQ949928
<i>C. sloanei</i>	IMI 364297	<i>Theobroma cacao</i>	Malásia	JQ948287	JQ948617	JQ949938
<i>C. sp.</i>	CBS 101611	<i>Fern</i>	Costa Rica	JQ948196	JQ948526	JQ949847
<i>C. tamarilloi</i>	CBS 129814	<i>Solanum betaceum</i>	Colômbia	JQ948184	JQ948514	JQ949835
	CBS 129954	<i>Solanum betaceum</i>	Colômbia	JQ948188	JQ948518	JQ949839
<i>C. walleri</i>	CBS 125472	<i>Coffea</i> sp.	Vietnã	JQ948275	JQ948605	JQ949926

FONTE: O autor (2020).

¹ CBS: Culture collection of Centraalbureau voor Schimmecultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Coleção de trabalho do Pedro W. Crous, CBS, Utrecht, Holanda; Col: Coleção pessoal do prof. Dr. Nelson Massola, ESALQ/USP, Departamento de Fitopatologia, Piracicaba, São Paulo, Brasil; IMI: Culture collection of CABI Europe UK Centre, Egham, Auckland, New Zealand; LEMID: Coleção micológica do laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. Isolados em negrito são provenientes deste estudo.

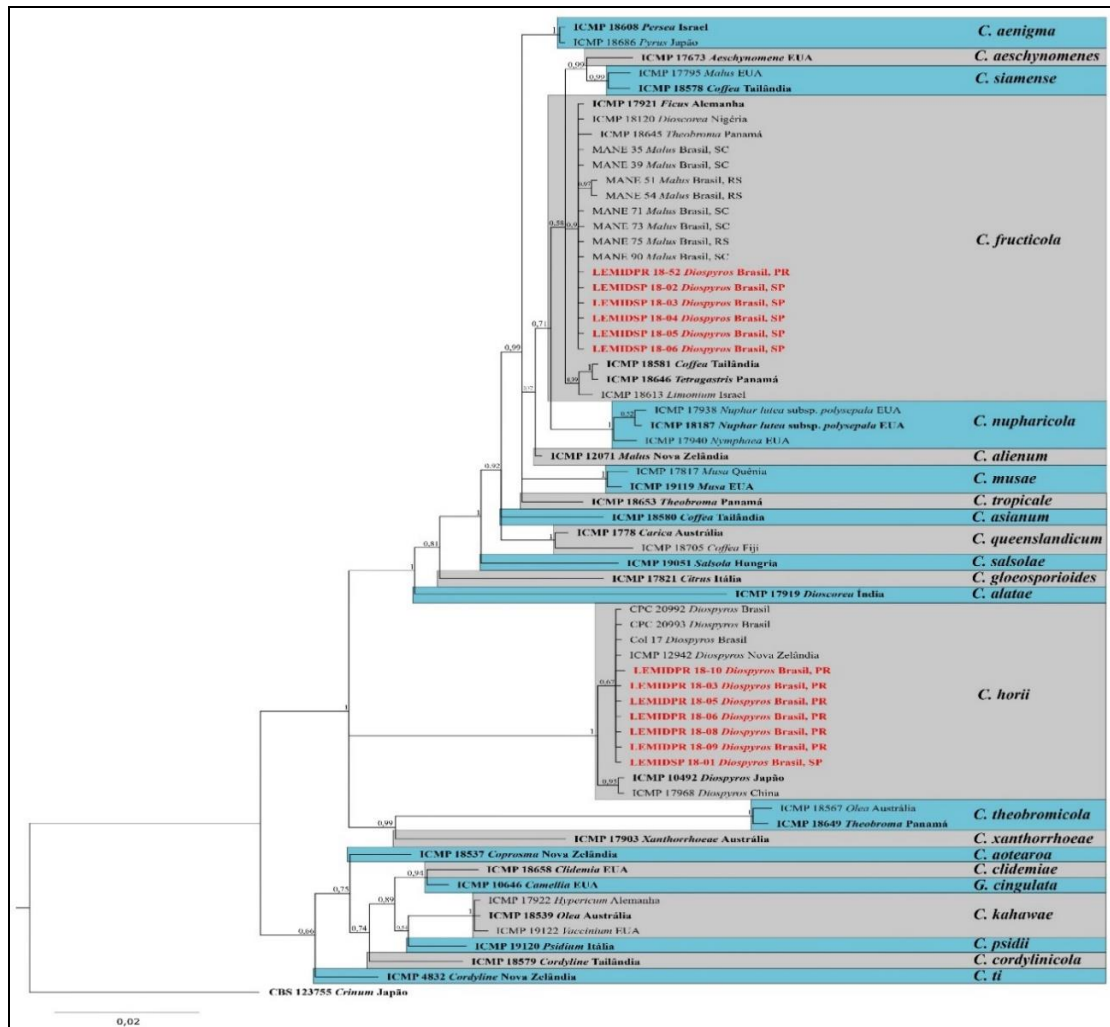
² Culturas Ex-holotype ou ex-epitype. Isolados publicados por Damm et al. (2012); Velho et al. (2015) e Bragança et al. (2016).

³ Isolado usado como *outgroup*.

Para o complexo *C. gloeosporioides*, foram obtidas as sequências de DNA de 64 isolados, incluindo o *outgroup* (*C. boninense* CBS 123755) e os isolados provenientes deste estudo ($n = 13$), gerando alinhamento multigênico de 1142 pb (TABELA 4). Os comprimentos dos fragmentos gênicos foram: GAPDH: 1-199, ITS: 200-705, TUB2: 706-1142. Para a IB, foram estimados os modelos evolutivos para cada gene, com base no critério AIC, sendo o modelo HKY para GAPDH, GTR + G para ITS e SYM + I para TUB2.

Os isolados LEMIDSPDk 18-02, LEMIDSPDk 18-03, LEMIDSPDk 18-04, LEMIDSPDk 18-05 e LEMIDSPDk 18-06 se agruparam no clado de *C. fructicola*; enquanto os isolados LEMIDPRDk 18-03, LEMIDPRDk 18-05, LEMIDPRDk 18-06, LEMIDPRDk 18-08, LEMIDPRDk 18-09, LEMIDPRDk 18-10, LEMIDPRDk 18-52 e LEMIDSPDk 18-01 foram identificados como *C. horii* (FIGURA 5).

FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE 64 ISOLADOS DO COMPLEXO *C. gloeosporioides*, INCLUINDO O *OUTGROUP*, CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE INFERÊNCIA BAYESIANA (IB), COM A CONCATENAÇÃO DA REGIÃO ITS-DNA E GENES PARCIAIS GAPDH E TUB2.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Os valores da probabilidade posterior Bayesiana (BPP) estão sendo mostrados à esquerda dos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão em vermelho e, em negrito, estão os isolados *ex-type*. O isolado *C. boninense* CBS 123755 está sendo utilizado como o *outgroup*. A barra de escala de 0,02 indica o número de alterações dos nucleotídeos.

As sequências geradas de cada um dos isolados deste estudo foram depositadas no GenBank, com os respectivos códigos de acesso (TABELA 4).

TABELA 4 - ESPÉCIES DO COMPLEXO *C. gloeosporioides* UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK

ESPÉCIES	NÚMERO DE ACESSO ¹	HOSPEDEIRO	PAÍS/ESTADO	NÚMERO GENBANK		
				ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608 ²	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010044	JX010389
	ICMP 18686	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japão	JX010243	JX009913	JX010390
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673 ²	<i>Aeschynomene cirginica</i>	EUA	JX010176	JX009930	JX010392
<i>C. alatae</i>	ICMP 17919 ²	<i>Dioscorea alata</i>	Índia	JX010190	JX009990	JX010383
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071 ²	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	JX010251	JX010028	JX010411
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537 ²	<i>Coprosma</i> sp.	Nova Zelândia	JX010205	JX010005	JX010420
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580 ²	<i>Coffea arabica</i> , cv. Typica	Tailândia	FJ972612	JX010053	JX010406
<i>C. boninense</i>	CBS 123755 ^{2,3}	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japão	JX010292	JX009905	
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658 ²	<i>Clidemia hirta</i>	EUA, Hawaii	JX010265	JX009989	JX010438
<i>C. cordylinicola</i>	ICMP 18579 ²	<i>Cordyline fruticosa</i>	Tailândia	JX010226	JX009975	JX010440
<i>C. fruticola</i>	ICMP 18581 ²	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010165	JX010033	JX010405
	ICMP 18613	<i>Limonium sinuatum</i>	Israel	JX010167	JX009998	JX010388
	ICMP 18120	<i>Dioscorea alata</i>	Nigéria	JX010182	JX010041	JX010401
	ICMP 18645	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010172	JX009992	JX010408
	MANE 35	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Santa Catarina	KJ200601	KJ469475	KJ469489
	MANE 39	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Santa Catarina	KJ200607	KJ469478	KJ469495
	MANE 51	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Rio Grande do Sul	KJ200611	KJ469480	KJ469499
	MANE 54	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Rio Grande do Sul	KJ200612	KJ469486	KJ469500
	MANE 71	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Santa Catarina	KJ200605	KJ469487	KJ469493
	MANE 73	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Santa Catarina	KJ200610	KJ469481	KJ469498
	MANE 75	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Rio Grande do Sul	KJ200613	KJ469482	KJ469501
	MANE 90	<i>Malus domestica</i>	Brasil, Santa Catarina	KJ200606	KJ469483	KJ469494
	LEMIDSPDk 18-2	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, São Paulo	MN964895	MN982431	MN982444
	LEMIDSPDk 18-3	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, São Paulo	MN959826	MN982432	MN982445
	LEMIDSPDk 18-4	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, São Paulo	MN959828	MN982433	MN982446
	LEMIDSPDk 18-5	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, São Paulo	MN959854	MN982434	MN982447
	LEMIDSPDk 18-6	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, São Paulo	MH750230	MH750233	MK209630
	LEMIDPRDk 18-52	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MK208463	MK208861	MK205153
<i>C. fruticola</i> (syn. <i>C. ignotum</i>)	ICMP 18646 ²	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá	JX010173	JX010032	JX010409

continua

TABELA 4 - ESPÉCIES DO COMPLEXO *C. gloeosporioides* UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK

continua

ESPÉCIES	NÚMERO DE ACESSO ¹	HOSPEDEIRO	PAÍS/ESTADO	NÚMERO GENBANK		
				ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>minor</i>)	ICMP 17921 ²	<i>Ficus edulis</i>	Alemanha	JX010181	JX009923	JX010400
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878, ICMP 17821 ²	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JX010152	JX010056	JX010445
<i>C. horii</i>	ICMP 10492 ²	<i>Diospyros kaki</i>	Japão	GQ329690	GQ329681	JX010450
	ICMP 17968	<i>Diospyros kaki</i>	China	JX010212	GQ329682	JX010378
	ICMP 12942	<i>Diospyros kaki</i>	Nova Zelândia	GQ329687	GQ329685	JX010375
	Col 17	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil	KC566803	KC566657	KC566225
	CPC 20992	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil	KC566801	KC566655	KC566223
	CPC 20993	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil	KC566802	KC566656	KC566224
	LEMIDPRDk 18-3	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN959853	MN982436	MN982451
	LEMIDPRDk 18-5	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN959855	MN982437	MN982452
	LEMIDPRDk 18-6	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN999482	MT005745	MT005746
	LEMIDPRDk 18-8	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN964894	MN982438	MN982449
	LEMIDPRDk 18-9	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN959858	MN982439	MN982450
	LEMIDPRDk 18-10	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, Paraná	MN959861	MN982440	
	LEMIDSPDk 18-1	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil, São Paulo	MN959860	MN982435	MN982448
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 18539 ²	<i>Olea europaea</i>	Austrália	JX010230	JX009966	JX010434
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>migrans</i>)	CBS 237.49, ICMP 17922 ²	<i>Hypericum perforatum</i>	Alemanha	JX010238	JX010042	JX010432
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella rufomaculans</i> var. <i>vaccinii</i>)	ICMP 19122	<i>Vaccinium</i> sp.	EUA	JX010228	JX009950	JX010433
<i>C. musae</i>	ICMP 17817	<i>Musa sapientum</i>	Quênia	JX010142	JX010015	JX010395
	CBS 116870, ICMP 19119 ⁽²⁾	<i>Musa</i> sp.	EUA	JX010146	JX010050	HQ596280
<i>C. nupharicola</i>	ICMP 17938	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	EUA	JX010189	JX009936	JX010397
	ICMP 17940	<i>Nymphaea odorata</i>	EUA	JX010188	JX010031	JX010399
	CBS 470.96, ICMP 18187 ²	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	EUA	JX010187	JX009972	JX010398
<i>C. psidii</i>	CBS 145.29, ICMP 19120 ²	<i>Psidium</i> sp.	Itália	JX010219	JX009967	JX010443
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778 ²	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JX010276	JX009934	JX010414
	ICMP 18705	<i>Coffea</i> sp.	Fiji	JX010185	JX010036	JX010412

TABELA 4 - ESPÉCIES DO COMPLEXO *C. gloeosporioides* UTILIZADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO, HOSPEDEIROS, PAÍSES/ESTADOS E NÚMERO DO GENBANK

ESPÉCIES	NÚMERO DE ACESSO ¹	HOSPEDEIRO	PAÍS/ESTADO	conclusão NÚMERO GENBANK		
				ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051 ²	<i>Salsola tragus</i>	Hungria	JX010242	JX009916	JX010403
<i>C. siamense</i>	ICMP 17795	<i>Malus domestica</i>	EUA	JX010162	JX010051	JX010393
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 18578 ²	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010171	JX009924	JX010404
	ICMP 18567	<i>Olea europaea</i>	Austrália	JX010287	JX009985	JX010377
	ICMP 18649 ²	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010294	JX010006	JX010447
<i>C. ti</i>	ICMP 4832 ²	<i>Cordyline</i> sp.	Nova Zelândia	JX010269	JX009952	JX010442
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949, ICMP 18653 ²	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010007	JX010407
<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094, ICMP 17903 ²	<i>Xanthorrhoeae preissii</i>	Austrália	JX010261	JX009927	JX010448
<i>Glomerella cingulata</i> "f. sp. <i>camelliae</i> "	ICMP 10646	<i>Camellia sasanqua</i>	EUA	JX010225	JX009993	JX010437

FONTE: O autor (2020).

¹ Centraalbureau voor Schimmecultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Coleção de trabalho do Pedro W. Crous, CBS, Utrecht, Holanda; Col: Coleção pessoal do prof. Dr. Nelson Massola, ESALQ/USP, Departamento de Fitopatologia, Piracicaba, São Paulo, Brasil; IMI: Culture collection of CAB International, UK Centre, Egham, Auckland, New Zealand; BRIP: Plant Pathology Herbarium, Department of Employment, Economic, Development and Innovation, Queensland, Australia; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants Auckland, New Zealand; MANE: Coleção micológica do laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil; LEMID: Coleção micológica do laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. Isolados em negrito são provenientes deste estudo.

² Culturas Ex-holotype ou ex-epitype. Isolados publicados por Weir, Johnston e Damm (2012) e Bragança et al. (2016).

³ Isolado usado como *outgroup*.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

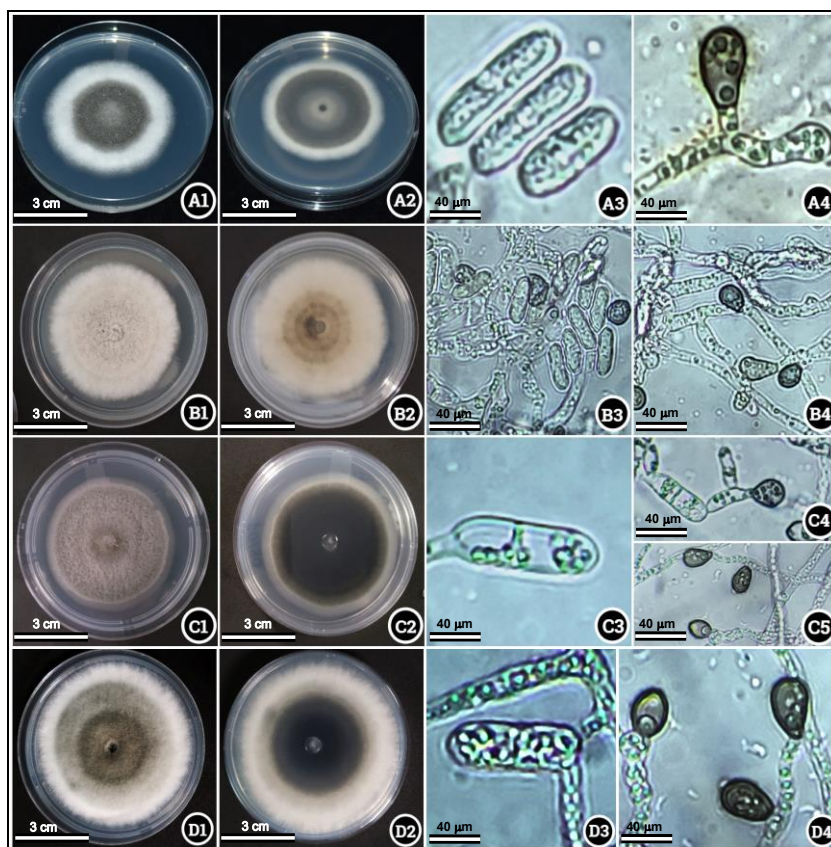
3.2.1 *C. horii* (isolados PRDk 18-06, PRDk 18-08, PRDk 18-10, SPDk 18-01)

Diferentes aspectos culturais foram observados para isolados pertencentes à espécie *C. horii*. O verso e reverso da colônia do isolados PRDk 18-06 apresentaram coloração branco na borda para cinza escuro no centro (FIGURA 6 A1-A2). O isolado PRDk 18-08 apresentou, no verso da colônia, coloração branca na borda para levemente marrom acinzentado no centro, e marrom escuro a claro no reverso (FIGURA 6 B1-B2). O isolado PRDk 18-10 apresentou aspectos de coloração cinza (uniforme) no verso e cinza escuro do centro para levemente claro na borda, no reverso (FIGURA 6 C1-C2). No isolado SPDk 18-01, no verso da colônia, observou-se coloração branco na borda para cinza, com a formação de anel concêntrico esverdeado no centro da placa e, no reverso, a coloração foi cinza escuro do centro para branco na borda (FIGURA 6 D1-D2).

Todos os isolados apresentaram micélios com texturas cotonosas e densas e, após o crescimento, apenas os isolados PRDk 18-08 e PRDk 18-10 mostraram formação de massa de conídios nas placas (dado não mostrado). Quanto ao formato dos conídios, todos foram compridos, hialinos, cilíndricos, com as extremidades obtusas, em ambos os lados (FIGURA 6 A3-D3). As larguras, comprimentos e volumes dos conídios variaram de 19,85 - 21,78 μm , 6,05 – 7,39 μm e 636,05 – 857,37 μm , respectivamente (TABELA 5).

A formação dos apressórios ocorreu tanto pelo tubo germinativo dos conídios, quanto pelas hifas, com formatos arredondados, contornos uniformes e poucos lobos irregulares (FIGURA 6 A4-D4). A taxa de melanização dos apressórios variou de 68 a 74% (FIGURA 10).

FIGURA 6 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DOS ISOLADOS DE *C. horii*



FONTE: O autor (2020).

NOTA: LEMIDPRDk 18-06 (A1-A4), LEMIDPRDk 18-08 (B1-B4), LEMIDPRDk 18-10 (C1-C5) e LEMIDSPDk 18-01 (D1-D4). Verso (A1-D1) e reverso (A2-D2) das colônias crescidas em BDA, após 10 dias da inoculação; formato cilíndrico dos conídios, com as extremidades arredondadas (A3-D3); apressórios melanizados (A4-D4).

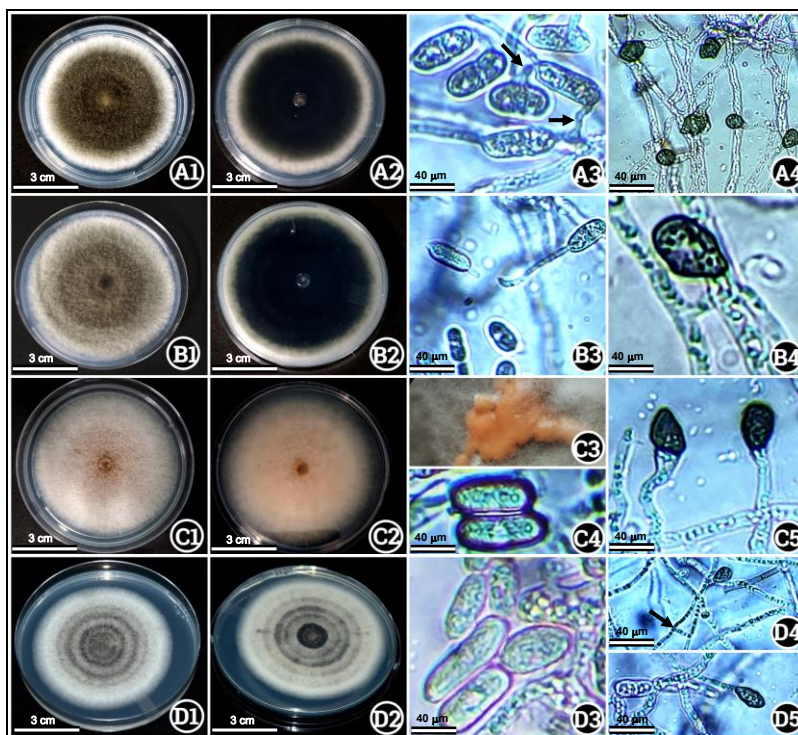
3.2.2 *C. fructicola* (isolados SPDk 18-02, SPDk 18-04, SPDk 18-05, SPDk 18-06)

Assim como observado para o *C. horii*, a espécie *C. fructicola* também apresentou variações culturais das colônias entre os isolados caracterizados. As colônias dos isolados SPDk 18-02 (FIGURA 7 A1-A2) e SPDk 18-04 (FIGURA 7 B1-B2) mostraram haver semelhanças nos aspectos culturais, com texturas miceliais cotonosas e densas, com coloração no verso de branco nas bordas para verde acinzentado no centro e, no reverso, verde-oliva escuro. Porém o isolado SPDk 18-04 apresentou, no verso da colônia, as colorações mais suaves, claras, quando comparado com o isolado SPDk 18-02. O isolado SPDk 18-05 apresentou textura micelial liso a cotonoso no verso da colônia, com coloração cinza-esbranquiçado e massa de conídios alaranjada ao redor do ponto de inóculo e, no reverso, foi

semelhante, mas com coloração rosada no centro da placa (FIGURA 7 C1-C2). O isolado SP*Dk* 18-06 apresentou coloração de branco nas bordas, com intercalações em anéis concêntricos de cinza claro e escuro até o centro, sendo evidenciado no reverso da colônia (FIGURA 7 D1-D2). No geral, os formatos dos conídios foram cilíndricos, com as extremidades obtusas a arredondadas, e alguns apresentaram também formato levemente clavado (FIGURA 7 A3-D3). As larguras, comprimentos e volumes dos conídios variaram de 13,44 – 14,22 μm , 6,26 – 6,72 μm e 428,66 – 508,16 μm , respectivamente, sendo observados menores comprimento e volume para o isolado SP*Dk* 18-05, quando comparado aos outros três, que apresentaram valores equivalentes (TABELA 5).

Em relação à formação dos apressórios, foi possível identificar variação de três tipos de formatos: lobados, levemente lobados e arredondados (FIGURA 7 A4-D5), com taxa de melanização de 74 a 78% (FIGURA 10).

FIGURA 7 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DOS ISOLADOS DE *C. fruticola*



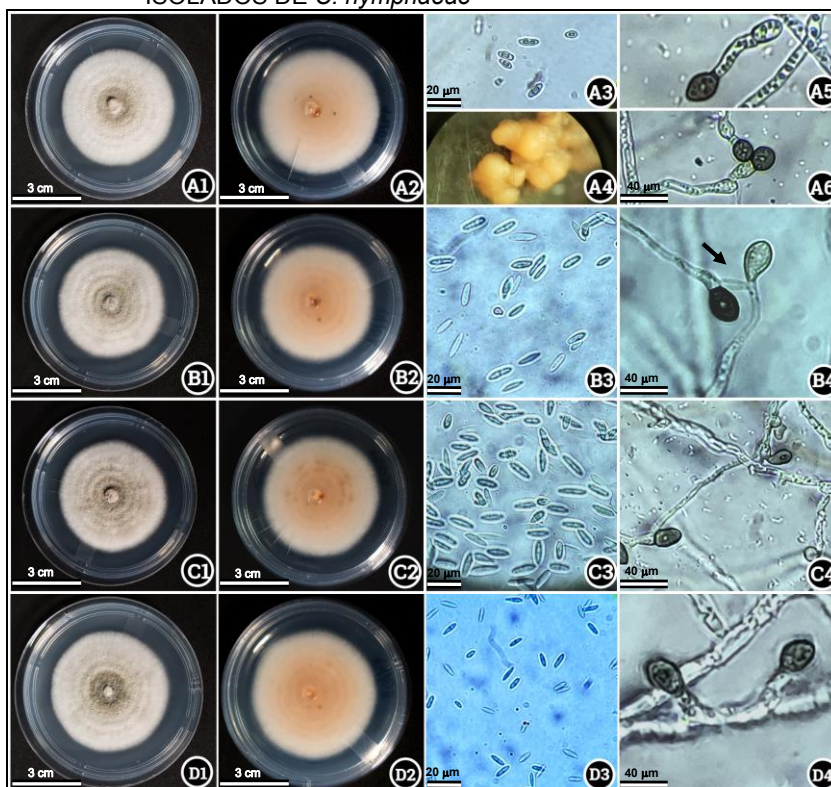
FONTE: O autor (2020).

NOTA: LEMIDSP*Dk* 18-02 (A1-A4), LEMIDSP*Dk* 18-04 (B1-B4), LEMIDSP*Dk* 18-05 (C1-C5) e LEMIDSP*Dk* 18-06 (D1-D4). Verso (A1-D1) e reverso (A2-D2) das colônias, crescidas em BDA, após 10 dias da inoculação; formato cilíndrico dos conídios, com as extremidades obtusas a arredondadas (A3-D3), alguns levemente clavados (D3); massa de conídios (C3); apressórios melanizados, com formatos lobados (A1), levemente lobados (B4 e C5) e arredondados (D5); tubos de anastomose conidial (A3, B4 e D4).

3.2.3 *C. nymphaeae* (isolados PRDk 18-01, PRDk 18-02, PRDk 18-04, PRDk 18-07)

Para todos os isolados, as colônias no verso apresentaram coloração cinza claro nas bordas para escuro ao redor do ponto de inóculo (FIGURA 8 A1-D1) e o reverso com a colônia alaranjada a levemente rosada do centro para cinza claro nas bordas (FIGURA 8 A2-D2). Todos os isolados apresentaram os micélios com textura lisa. Os formatos dos conídios foram fusiformes, com as extremidades agudas, porém também foram observados alguns conídios com ápice arredondado e outro agudo (FIGURA 8 A3-D3). As larguras, comprimentos e volumes variaram de 10,06 – 11,61 μm , 3,77 – 5,11 μm e 123,50 – 213,84 μm , respectivamente (TABELA 5). Quanto ao formato dos apressórios, a maioria dos isolados apresentaram formas de levemente lobados para arredondados, com a predominância do segundo formato (FIGURA 8 A5-D4). As taxas de apressórios melanizados foram de 47 – 57% (FIGURA 10).

FIGURA 8 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DOS ISOLADOS DE *C. nymphaeae*



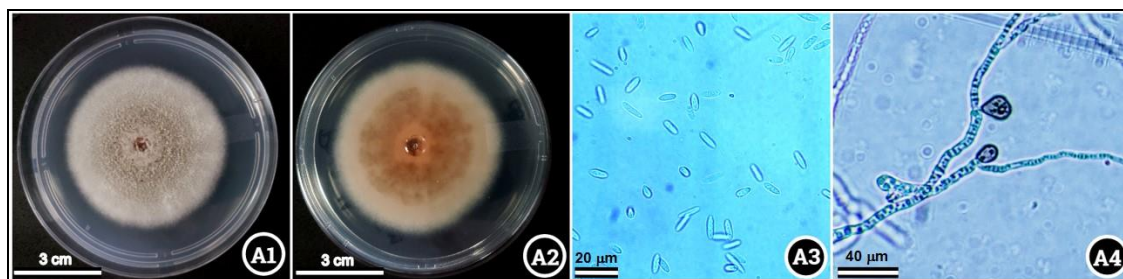
FONTE: O autor (2020).

NOTA: LEMIDPRDk 18-01 (A1-A6), LEMIDPRDk 18-02 (B1-B4), LEMIDPRDk 18-04 (C1-C4) e LEMIDPRDk 18-07 (D1-D4). Verso (A1-D1) e reverso (A2-D2) das colônias, crescidas em BDA, após 10 dias da inoculação; formato fusiforme dos conídios, com as extremidades agudas (A3-D3); massas de conídios (A4); apressórios melanizados, com formatos levemente lobados (A5 e D4) e arredondados (A6, B4, C4); tubo de anastomose conidial (B4 e C4).

3.2.4 *C. melonis* (isolado PRDk 18-11)

Foi observado aspecto micelial com textura lisa, de coloração cinza claro (uniforme), com massa de conídios ao redor do ponto de inóculo, no verso da colônia e, no reverso, com coloração alaranjada no centro para cinza nas bordas (FIGURA 9 A1-A2). Os conídios apresentaram formatos cilíndricos para clavados, com as extremidades agudas, às vezes, com ápice arredondado (FIGURA 9 A3). A largura, comprimento e volume foram de 9,62 μm , 5,21 μm e 219,25 μm , respectivamente (TABELA 5). Os apressórios apresentaram formatos globosos a ovais, com taxa de melanização de 57% (FIGURA 9 A4; FIGURA 10).

FIGURA 9 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS DO ISOLADO DE *C. melonis*



FONTE: O autor (2020).

NOTA: LEMIDPRDk 18-01 (A1-A4), verso (A1) e reverso (A2) das colônias, crescidas em BDA, após 10 dias da inoculação; formato cilíndrico para clavado dos conídios, com as extremidades agudas (A3); apressórios melanizados, com formatos globosos a ovais (A4).

Na Tabela 5, estão os dados culturais da colônia (cor e textura) e a morfologia dos conídios (forma, largura, comprimento e volume), para cada isolado caracterizado. Os isolados pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* apresentaram maior variabilidade do que os isolados do complexo *C. acutatum*, em relação às características culturais. No geral, quanto ao tamanho dos conídios, os isolados de *C. horii*, apresentaram maior comprimento e volume que os demais.

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS MORFOCULTURAIS DAS COLÔNIAS (COLORAÇÃO DO VERSO E REVERSO, TEXTURA DOS MICÉLIOS) E CONÍDIOS (FORMA, LARGURA, COMPRIMENTO E VOLUME) DOS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum* spp. DE CAQUIZEIRO

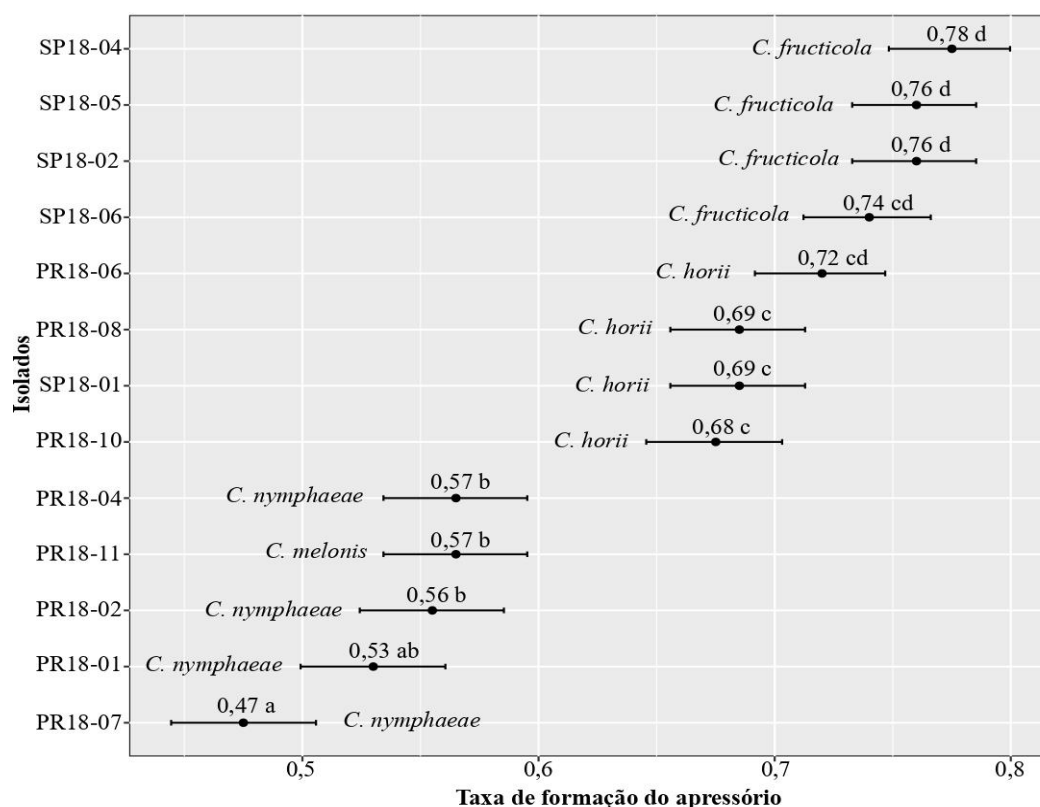
ISOLADOS	<i>Colletotrichum</i> spp.	VERSO DA COLÔNIA COLORAÇÃO ¹	TEXTURA MICELIAL ¹	REVERSO DA COLÔNIA COLORAÇÃO ¹	MORFOLOGIA DOS CONÍDIOS (µm) e std ²			
					Forma	Comprimento	Largura	Volume
PR18-10	<i>C. horii</i>	Cinza (uniforme)	Cotonoso	Cinza escuro para levemente claro na borda	Cilíndrico	21,78 ± 0,41 d	7,39 ± 0,19 de	857,37 ± 0,16 f
PR18-06	<i>C. horii</i>	Branco na borda para cinza escuro no centro	Cotonoso	Branco na borda para cinza escuro no centro	Cilíndrico	20,92 ± 0,56 d	6,70 ± 0,26 cd	748,61 ± 0,23 ef
PR18-08	<i>C. horii</i>	Branco na borda para marrom acinzentado no centro	Cotonoso	Marrom escuro para claro	Cilíndrico	19,85 ± 0,41 d	6,46 ± 0,19 cd	741,21 ± 0,16 ef
SP18-01	<i>C. horii</i>	Branco na borda para cinza, com anel concêntrico esverdeado no centro	Cotonoso	Cinza escuro do centro para branco na borda	Cilíndrico	21,67 ± 0,41 d	6,05 ± 0,19 bcd	636,05 ± 0,16 def
SP18-02	<i>C. fruticola</i>	Branco na borda para verde acinzentado no centro	Cotonoso	Verde-oliva escuro	Cilíndrico	13,59 ± 0,40 bc	6,55 ± 0,19 cd	470,91 ± 0,16 cd
SP18-04	<i>C. fruticola</i>	Branco na borda para verde acinzentado no centro	Cotonoso	Verde-oliva escuro	Cilíndrico	13,60 ± 0,40 bc	6,26 ± 0,19 cd	432,08 ± 0,16 c
SP18-05	<i>C. fruticola</i>	Cinza-esbranquiçado, com massa de conídios ao redor do ponto de inóculo	Liso a cotonoso	Rosado no centro para cinza-esbranquiçado	Cilíndrico	14,22 ± 0,41 c	6,72 ± 0,19 cd	508,17 ± 0,16 cde
SP18-06	<i>C. fruticola</i>	Branco nas bordas, com anéis concêntricos de cinza claro e escuro até o centro	Cotonoso	Branco nas bordas, com anéis concêntricos de cinza claro e escuro até o centro	Cilíndrico	13,44 ± 0,45 bc	6,55 ± 0,26 cd	467,28 ± 0,18 cd
PR18-01	<i>C. nymphaeae</i>	Cinza claro na borda para escuro no centro	Liso	Alaranjado a levemente rosada do centro para cinza claro na borda	Fusiforme	10,06 ± 0,41 a	5,11 ± 0,19 b	213,84 ± 0,17 b
PR18-02	<i>C. nymphaeae</i>	Cinza claro na borda para escuro no centro	Liso	Alaranjado a levemente rosada do centro para cinza claro na borda	Fusiforme	10,27 ± 0,48 a	4,86 ± 0,23 ab	195,11 ± 0,19 ab
PR18-04	<i>C. nymphaeae</i>	Cinza claro na borda para escuro	Liso	Alaranjado a levemente rosada do centro para cinza claro na borda	Fusiforme	11,61 ± 0,39 ab	3,98 ± 0,18 a	151,42 ± 0,16 ab
PR18-07	<i>C. nymphaeae</i>	Cinza claro na borda para escuro	Liso	Alaranjado a levemente rosada do centro para cinza claro na borda	Fusiforme	10,64 ± 0,40 a	3,77 ± 0,19 a	123,50 ± 0,16 a
PR18-11	<i>C. melonis</i>	Cinza claro (uniforme), com massa de conídios no centro	Liso	Alaranjado no centro para cinza na borda	Cilíndrico-clavado	9,62 ± 0,41 a	5,21 ± 0,19 bc	219,25 ± 0,16 b

FONTE: O autor (2020).

¹ Coloração e textura dos micélios foram obtidas de colônias crescidas em meio BDA, por 7 dias, à incubação de 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas.² Cada medida representa a média de 100 conídios ± standard error. Valores médios de cada parâmetro (comprimento, largura e volume) com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste LSD em $\alpha = 0,05$. Conídios foram obtidos de colônias crescidas em meio BDA, por 10 dias, à incubação de 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Em relação à taxa de formação de apressório, houve diferença significativa ($P < 2 \times 10^{-16}$) entre os isolados. Os isolados do complexo *C. gloeosporioides* apresentaram taxa (%) de formação de apressórios melanizados superiores, com variação de 68 a 78%, quando comparados com os isolados do complexo *C. acutatum*, que apresentaram taxa de 47 a 57% nas condições analisadas do experimento (FIGURA 10).

FIGURA 10 - TAXA DE FORMAÇÃO DO APRESSÓRIO ENTRE OS ISOLADOS DE *Colletotrichum* DE CAQUIZEIRO



FONTE: O autor (2020).

NOTA: As barras representam a comparação das médias pelo teste LSD de Fisher, com intervalo de confiança de 95% e significância de $P=0,05$.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA (IN VITRO)

O efeito da temperatura ótima no crescimento micelial variou de 24,4°C para 26,8°C e, no ensaio de germinação de conídios, a variação foi de 23,7 a 26,3°C entre os isolados de *Colletotrichum* spp. (TABELA 6). Os isolados de *C. fructicola* apresentaram valores de temperatura ótima superiores aos demais isolados, tanto para o crescimento micelial, quanto para a germinação de conídios, com

temperaturas médias de 26,6°C e 26,2°C, respectivamente. O índice de velocidade do crescimento micelial – IVCM (mm/dia) variou de 4,7 mm/dia para 7,2 mm/dia, sendo observado maior crescimento micelial diário para os isolados de *C. fructicola* (> 6 mm/dia). Consequentemente, os isolados dessa espécie revelaram o maior diâmetro das colônias na temperatura ótima, quando comparado com os demais isolados (TABELA 6).

TABELA 6 - EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICIAL E GERMINAÇÃO PARA OS ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum* spp. DE CAQUIZEIRO, INCUBADOS A 5, 10, 15, 20, 25, 30, E 35°C, NO ESCURO, POR 7 DIAS OU 12 HORAS, PARA O CRESCIMENTO MICIAL E A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS, RESPECTIVAMENTE

ESPÉCIES	ISOLADOS LEMIDDk	TEMPERATURA (°C) CRESCIMENTO MICIAL ¹			IVCM ² (mm/dia)	TEMPERATURA (°C) GERMINAÇÃO ¹		
		Mínima	Ótima	Máxima		Mínima	Ótima	Máxima
<i>C. fructicola</i>	SP 18-02	10,0	26,4	35,0	6,6	8,0	26,2	35,0
<i>C. fructicola</i>	SP 18-03	10,0	26,8	35,0	7,2	8,0	26,1	36,0
<i>C. fructicola</i>	SP 18-05	10,0	26,8	36,0	7,1	8,0	26,3	36,0
<i>C. fructicola</i>	SP 18-06	10,0	26,5	35,0	6,6	8,0	26,0	36,0
<i>C. horii</i>	SP 18-01	9,0	25,3	34,0	5,3	7,0	25,3	34,0
<i>C. horii</i>	PR 18-06	9,0	25,2	34,0	5,4	6,0	24,9	34,0
<i>C. horii</i>	PR 18-08	9,0	25,4	34,0	5	7,0	25,4	34,0
<i>C. horii</i>	PR 18-10	10,0	25,4	34,0	5	7,0	25,0	34,0
<i>C. nymphaeae</i>	PR 18-01	6,0	24,4	34,0	4,9	6,0	23,8	34,0
<i>C. nymphaeae</i>	PR 18-02	6,0	24,6	34,0	4,7	6,0	23,7	34,0
<i>C. nymphaeae</i>	PR 18-04	6,0	24,5	34,0	4,9	6,0	23,7	34,0
<i>C. nymphaeae</i>	PR 18-07	6,0	24,7	34,0	5	6,0	23,7	34,0
<i>C. melonis</i>	PR 18-11	6,0	24,6	34,0	4,7	6,0	23,8	34,0
Médias de temperatura ótima por espécie de <i>Colletotrichum</i>	<i>C. fructicola</i>		26,6			<i>C. fructicola</i>	26,2	
	<i>C. horii</i>		25,3			<i>C. horii</i>	25,1	
	<i>C. nymphaeae</i>		24,6			<i>C. nymphaeae</i>	23,7	
	<i>C. melonis</i>		24,6			<i>C. melonis</i>	23,8	

FONTE: O autor (2020).

¹ Valores médios de temperatura mínima, ótima e máxima, com intervalo de confiança de 95%. Para cada isolado/espécie de *Colletotrichum* spp., os crescimentos médios das temperaturas foram ajustados para regressão polinomial do terceiro grau e estimados os valores de temperatura ótima.

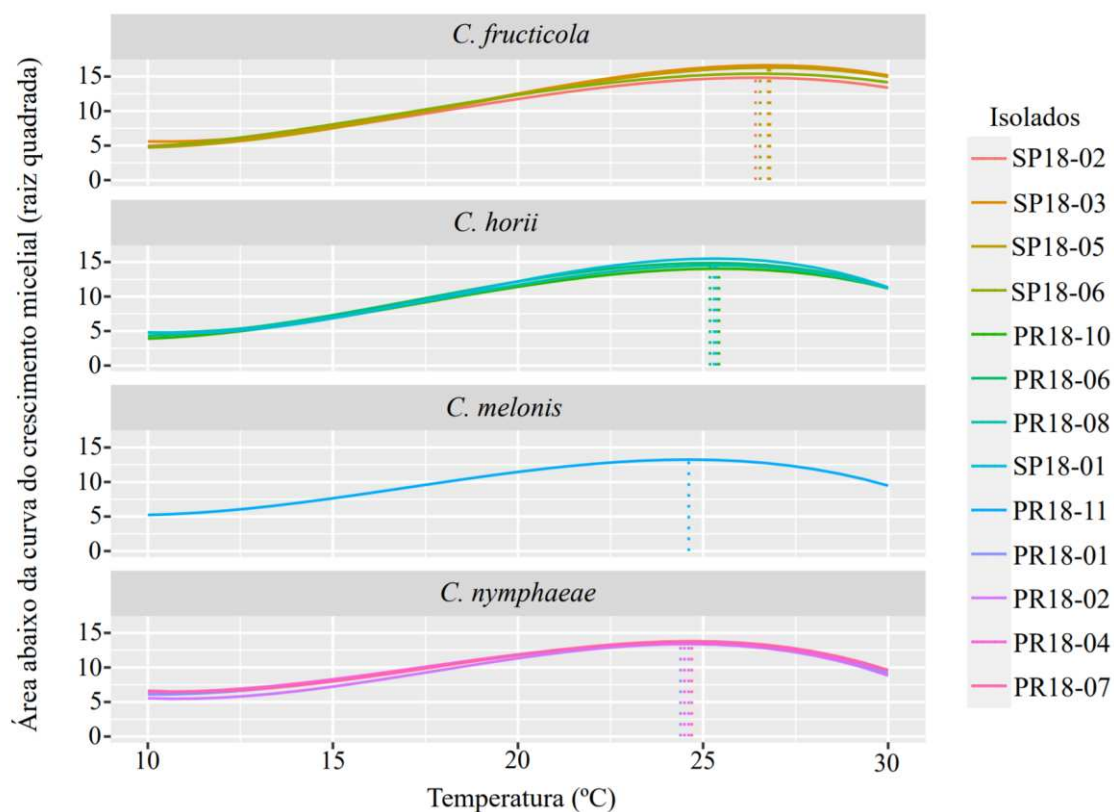
² Índice de velocidade do crescimento micelial, medido diariamente (mm/dia).

Na Figura 11, nota-se maior diâmetro das colônias para os isolados de *C. fructicola*, com os picos das curvas próximos ao máximo valor das áreas abaixo da curva de crescimento das colônias, sendo seguidos pelos isolados de *C. horii*, que também apresentaram maior crescimento das colônias no ponto ótimo de temperatura, enquanto os isolados de *C. nymphaeae* e *C. melonis* revelaram crescimento menor e mais lento.

Com as curvas das temperaturas, observa-se pequena variação da temperatura ótima entre espécies, sendo, para os isolados do complexo *C. gloeosporioides*, temperaturas entre 25 a 26°C favoráveis para o crescimento micelial,

enquanto, para os isolados do complexo *C. acutatum*, temperaturas próximas a 24°C foram favoráveis.

FIGURA 11 - EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL (mm/dia) DE TREZE ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum* spp.

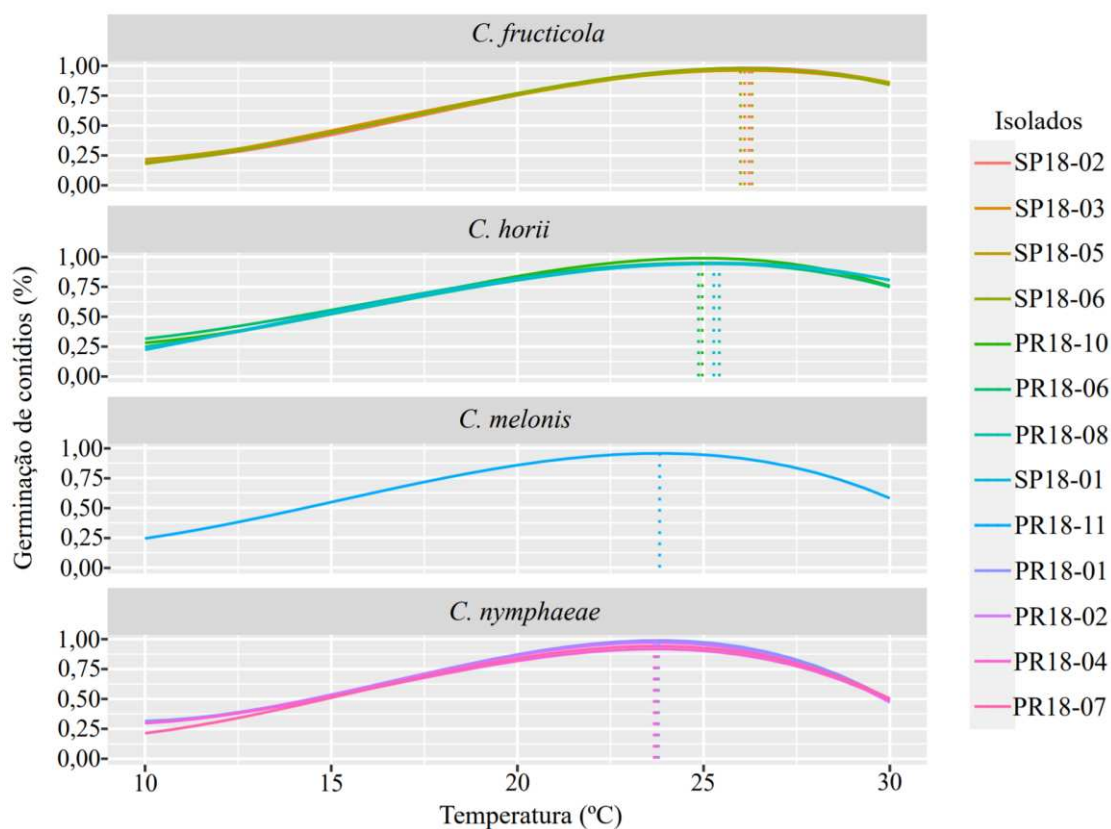


FONTE: O autor (2020).

NOTA: Incubados nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 E 35°C, no escuro, por 7 dias. Para cada isolado, as médias dos crescimentos diários foram ajustadas para a regressão polinomial do terceiro grau. O risco tracejado nas curvas de cada isolado indica o ponto de temperatura ótima.

A Figura 12 ilustra o efeito da temperatura ótima para germinação de conídios. Assim como observado para o ensaio de crescimento micelial, houve pequena diferença na estimativa da temperatura ótima para germinação dos conídios entre os isolados de *Colletotrichum* spp., porém temperaturas acima de 25°C foram favoráveis para as espécies *C. fructicola* e *C. horii*, enquanto temperaturas abaixo de 24°C foram favoráveis para as espécies *C. nymphaeae* e *C. melonis*.

FIGURA 12 - EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE TREZE ISOLADOS REPRESENTATIVOS DE *Colletotrichum* spp.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Incubados nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C, no escuro, por 12 horas. Para cada isolado, as médias da proporção de conídios germinados foram ajustadas para a regressão polinomial do terceiro grau. O risco tracejado nas curvas de cada isolado indica o ponto de temperatura ótima.

No geral, os isolados de *Colletotrichum* spp. de caquizeiro revelaram temperaturas ótimas para crescimento micelial e germinação de conídios próximas, entre 23 a 26°C, não havendo diferenças expressivas para essas características fisiológicas. Entretanto, foi observada grande amplitude térmica para desenvolvimento do crescimento micelial e para germinação dos conídios, com temperaturas variando desde 10°C até 35°C, porém sendo limitantes as temperaturas abaixo de 15°C e acima de 30°C. Na temperatura de 5°C, nenhum isolado revelou crescimento micelial e/ou germinação de conídios.

3.4 TESTES DE PATOGENICIDADE

3.4.1 Patogenicidade em órgãos vegetais destacados de caquizeiro (*ex vivo*)

Independente dos métodos de inoculação, todos os isolados foram patogênicos, causando lesões típicas às descritas para as espécies de *Colletotrichum*. Em frutos com ferimento, os isolados do complexo *C. gloeosporioides* causaram maiores lesões do que os isolados do complexo *C. acutatum*. Os diâmetros das lesões variaram de 14,89 – 18,92 mm (média 16,94 mm) para *C. fructicola* e de 14,36 – 16,89 mm (média 15,48 mm) para *C. horii*, enquanto, para o *C. nymphaeae*, foi de 11,42 – 13,69 mm (média 13,03 mm) e *C. melonis* com 12,25 mm. Porém, estatisticamente, não houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre a maioria dos isolados testados, pois apenas dois isolados de *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-05 e 18-06) e um isolado de *C. horii* (LEMIDPRDk 18-10) foram mais agressivos quando comparados com os isolados de *C. nymphaeae* e *C. melonis* (TABELA 7).

Na inoculação em frutos sem ferimento, todos os isolados também foram patogênicos, no entanto, causaram lesões menores do que as observadas em frutos com ferimento. Os isolados de *C. horii* mostraram ser mais agressivos quando comparados com as outras espécies nesse método de inoculação e a incidência de 90% da doença dos frutos inoculados para todos os isolados de *C. horii* foi superior aos demais. O isolado de *C. melonis* foi menos agressivo que os demais, com 5,8 mm de diâmetro da lesão, e incidência da doença de 60% dos frutos inoculados (TABELA 7).

No geral, a espécie *C. nymphaeae* apresentou PI e PL mais curto quando comparada com as demais, exceto para o ensaio com frutos sem ferimento, que revelaram uma incidência da doença menor e a infecção foi mais tardia (Tabela 7). Os frutos inoculados com água, que serviram como controle, não apresentaram sintomas da doença durante os ensaios.

TABELA 7 - PATOGENICIDADE DAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM FRUTOS DESTACADOS, INOCULADOS COM SUSPENSÃO DE ESPOROS (1×10^4 conídios mL⁻¹), COM E SEM FERIMENTO

ESPÉCIES ¹	ISOLADO ²	n	PI (dias) ³	PL (dias) ³	TAMANHO DE LESÃO COM FERIMENTO (mm) E std ⁴	INCIDÊNCIA (%)	PI (dias) ³	PL (dias) ³	TAMANHO DE LESÃO SEM FERIMENTO (mm) E std ⁴	INCIDÊNCIA (%)
<i>Cf</i>	SP18-05	10	3	5	18,92 ± 0,77 a	100	6	-	9,42 ± 0,18 abc	80,0
<i>Cf</i>	SP18-06	10	3	5	17,47 ± 0,31 ab	100	4	-	11,02 ± 0,64 ab	80,0
<i>Ch</i>	PR18-10	10	3	6	16,89 ± 0,45 abc	100	5	-	9 ± 0,23 bc	90,0
<i>Cf</i>	SP18-03	10	3	5	16,48 ± 0,50 abcd	100	5	-	10,95 ± 0,84 ab	70,0
<i>Ch</i>	PR18-06	10	3	6	16,32 ± 0,34 abcd	100	4	-	12,11 ± 0,58 a	90,0
<i>Cf</i>	SP18-02	10	3	6	14,89 ± 0,30 bcde	100	6	-	9,61 ± 0,49 abc	80,0
<i>Ch</i>	SP18-01	10	3	7	14,36 ± 0,28 cde	100	4	-	11,35 ± 0,29 ab	90,0
<i>Ch</i>	PR18-09	10	3	7	14,36 ± 0,29 cde	90	5	-	8,76 ± 0,35 bc	90,0
<i>Cn</i>	PR18-07	10	2	4	13,69 ± 0,35 def	100	6	-	7,78 ± 0,43 cd	70,0
<i>Cn</i>	PR18-04	10	2	4	13,61 ± 0,26 def	100	7	-	7,95 ± 0,55 cd	70,0
<i>Cn</i>	PR18-01	10	2	4	13,39 ± 0,59 ef	100	7	-	8,87 ± 0,16 bc	70,0
<i>Cm</i>	PR18-11	10	4	6	12,25 ± 0,41 ef	100	7	-	5,8 ± 0,37 d	60,0
<i>Cn</i>	PR18-02	10	2	5	11,42 ± 0,44 f	90	7	-	6 ± 0,37 d	80,0

FONTE: O autor (2020).

¹ *Cf* = *C. fructicola*; *Ch* = *C. horii*; *Cn* = *C. nymphaeae*; *Cm* = *C. melonis*.² Isolados pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID), UFPR, Curitiba-PR, Brasil.³ PI = período de incubação e PL = período de latência. 50% ou mais dos frutos, após a inoculação, apresentaram sintomas da doença ou sinais do patógeno. As avaliações foram realizadas diariamente, por 10 dias.⁴ Valores médios de raiz quadrada ± standard error, previamente transformados pela análise de Box-Cox. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste LSD em $\alpha = 0,05$.

Em relação à inoculação por disco de micélio, todos os isolados foram patogênicos, porém, para os frutos com ferimento, o isolado de *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-06) foi mais agressivo que os demais, com maior diâmetro de lesão (15,05 mm), e, entre os isolados *C. horii* e *C. nymphaeae*, não houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$). O *C. melonis* foi menos agressivo, com diâmetro de lesão de 7,56 mm. Para os frutos sem ferimento, o isolado de *C. horii* foi mais agressivo, com incidência da doença de 90% dos frutos avaliados e lesões maiores (5,06 mm) que os outros isolados, os quais não se diferenciaram significativamente ($\alpha = 0,05$) por esse método de inoculação (TABELA 8).

TABELA 8 - PATOGENICIDADE DAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM FRUTOS DESTACADOS, INOCULADOS COM DISCOS DE MICÉLIO (\varnothing 4 mm), COM E SEM FERIMENTO

ESPÉCIES ¹	ISOLADOS ²	n	TAMANHO DE LESÃO COM FERIMENTO (mm) E std ³	INCIDÊNCIA (%)	TAMANHO DE LESÃO SEM FERIMENTO (mm) E std ³	INCIDÊNCIA (%)
<i>Cf</i>	SP18-06	30	15,05 \pm 0,74 a	100	2,62 \pm 1,45 b	80,0
<i>Ch</i>	PR18-06	30	11,62 \pm 0,34 b	100	5,06 \pm 0,89 a	90,0
<i>Cn</i>	PR18-01	30	10,56 \pm 0,61 b	100	1,39 \pm 1,12 b	70,0
<i>Cm</i>	PR18-11	15	7,56 \pm 0,48 c	100	1,74 \pm 1,11 b	60,0

FONTE: O autor (2020).

¹ *Cf* = *C. fructicola*; *Ch* = *C. horii*; *Cn* = *C. nymphaeae*; *Cm* = *C. melonis*.

² Isolados pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID), UFPR, Curitiba-PR, Brasil.

³ Valores médios de raiz quadrada \pm standard error, previamente transformados pela análise de Box-Cox. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste LSD em $\alpha = 0,05$.

Quanto às folhas, ramos novos e sépalas destacados, todos os isolados avaliados causaram doença nesses tecidos vegetais. Tanto para as folhas inoculadas com ferimento, quanto para sem ferimento, os isolados do complexo *C. gloeosporioides* revelaram ser mais agressivos que os isolados do complexo *C. acutatum*, sendo o isolado de *C. horii* mais agressivo que os demais, diferenciando significativamente ($\alpha = 0,05$), exceto quando comparado com o isolado de *C. fructicola*. O isolado de *C. melonis* foi menos agressivo em ambos os métodos de inoculação (TABELA 9).

TABELA 9 - PATOGENICIDADE E SEVERIDADE DAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM DIFERENTES TECIDOS DE CAQUIZEIRO, COM E SEM FERIMENTO

ESPÉCIES ¹	ISOLADOS ²	FREQÜÊNCIA DA INFECÇÃO ³		DIÂMETRO DA LESÃO (mm) E std ⁴	
		Ferimento	Sem ferimento	Ferimento	Sem ferimento
		Folhas			
<i>Ch</i>	PR18-06	14/14	14/14	12,96 ± 0,24 a	5,15 ± 0,50 a
<i>Cf</i>	SP18-06	14/14	10/14	12,53 ± 0,47 ab	3,2 ± 1,3 ab
<i>Cn</i>	PR18-01	14/14	9/14	10,49 ± 0,56 b	1,48 ± 1,07 bc
<i>Cm</i>	PR18-11	14/14	6/14	7,95 ± 0,50 c	0,86 ± 1,12 c
		Ramos novos			
<i>Ch</i>	PR18-06	12/12	8/12	-	-
<i>Cf</i>	SP18-06	12/12	9/12	-	-
<i>Cn</i>	PR18-01	12/12	9/12	-	-
<i>Cm</i>	PR18-11	12/12	7/12	-	-
		Sépalas			
<i>Ch</i>	PR18-06	28/30	27/30	-	-
<i>Cf</i>	SP18-06	25/30	25/30	-	-
<i>Cn</i>	PR18-01	30/30	29/30	-	-
<i>Cm</i>	PR18-11	29/30	26/30	-	-

FONTE: O autor (2020).

¹ *Cf* = *C. fructicola*; *Ch* = *C. horii*; *Cn* = *C. nymphaeae*; *Cm* = *C. melonis*.² Isolados pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID), UFPR, Curitiba-PR, Brasil.³ Número de tecido infectado/número de tecido inoculado.⁴ Valores médios de raiz quadrada ± standard error, previamente transformados pela análise de Box-Cox. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste LSD em $\alpha = 0,05$.

3.4.2 Patogenicidade cruzada (*ex vivo*)

Todos os isolados testados foram capazes de infectar e causar doença tanto nos hospedeiros originais, quanto em diferentes hospedeiros, exceto o isolado de *C. horii* (LEMIDPRDk 18-06) de caquizeiro, que não infectou os frutos de pereira. Frutos de pereira foram mais suscetíveis às infecções por *Colletotrichum* spp. que os demais; apresentaram lesões que variaram de 21,99 – 36,48 mm, bem como os números de frutos infectados/esporulados foram superiores. Os diâmetros médios das lesões causadas pelos patógenos variaram de 7,78 – 16,63 mm para os frutos de caquizeiro, enquanto, para os frutos de macieira, variaram de 3,53 – 25,5 mm (TABELA 10).

O isolado de *C. fructicola* de macieira causou lesões menores tanto em macieira (6,86 mm), quanto em caquizeiro (7,78 mm) e pereira (21,99 mm). Para os frutos de macieira, o isolado de *C. horii* de caquizeiro e o isolado de *C. nymphaeae* de pereira também causaram lesões menores. No geral, os isolados de *C. fructicola* e *C. nymphaeae* de caquizeiro, e o isolado *C. nymphaeae* de macieira foram os mais agressivos, com diâmetros das lesões maiores e alta taxa de infecção e esporulação nos frutos inoculados (TABELA 10).

Todos os isolados também foram patogênicos quando inoculados em folhas e, contrário ao que foi observado para os frutos, o isolado de *C. horii* de caquizeiro revelou ser patogênico. Os períodos de incubação e de latência foram também estimados (TABELA 10).

TABELA 10 - PATOGENICIDADE CRUZADA ENTRE AS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* DE DIFERENTES HOSPEDEIROS, EM FRUTOS E FOLHAS DESTACADOS, COM FERIMENTO E SEM FERIMENTO, RESPECTIVAMENTE, DE CAQUIZEIRO (*D. kaki*), MACIEIRA (*M. domestica*) E PEREIRA (*P. communis*)

ESPÉCIES	ISOLADOS ¹	HOSPEDEIRO ORIGINAL	DIÂMETRO DA LESÃO (mm) NOS FRUTOS ²			FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO E ESPORULAÇÃO NOS FRUTOS ³ (PI e PL em dias)			FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO E ESPORULAÇÃO NAS FOLHAS ³ (PI e PL em dias)		
			Caquizeiro	Macieira	Pereira	Caquizeiro	Macieira	Pereira	Caquizeiro	Macieira	Pereira
<i>C. fructicola</i>	SP18-06	Caquizeiro	16,63 a	15,92 a	28,09 ab	8/7 (PI = 2; PL = 5)	9/7 (PI = 3; PL = 8)	9/9 (PI = 3; PL = 6)	10/6 (PI = 3; PL = 7)	9/7 (PI = 3; PL = 6)	8/6 (PI = 6; PL = 9)
<i>C. horii</i>	PR18-06	Caquizeiro	14,17 a	3,53 b	0 c	10/7 (PI = 2; PL = 5)	8/4 (PI = 7; PL = nd)	0/0 (PI = nd; PL = nd)	10/10 (PI = 2; PL = 5)	10/6 (PI = 2; PL = 6)	10/5 (PI = 5; PL = 8)
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-01	Caquizeiro	12,35 a	23,91 a	36,36 a	9/8 (PI = 2; PL = 4)	10/10 (PI = 3; PL = 7)	10/10 (PI = 3; PL = 4)	10/10 (PI = 3; PL = 4)	8/8 (PI = 3; PL = 5)	7/5 (PI = 7; PL = 9)
<i>C. fructicola</i>	Col 33	Macieira	7,78 b	6,86 b	21,99 b	9/1 (PI = 4; PL = nd)	7/0 (PI = 4; PL = nd)	10/8 (PI = 3; PL = 5)	8/6 (PI = 4; PL = 7)	10/9 (PI = 2; PL = 9)	6/6 (PI = 8; PL = 11)
<i>C. nymphaeae</i>	Col 15	Macieira	13,72 ab	25,5 a	33,98 a	9/9 (PI = 3; PL = 4)	10/8 (PI = 3; PL = 6)	10/10 (PI = 2; PL = 3)	8/8 (PI = 3; PL = 4)	9/8 (PI = 3; PL = 5)	8/6 (PI = 6; PL = 8)
<i>C. nymphaeae</i>	PR17-02	Pereira	11,6 ab	6,25 b	36,48 a	10/9 (PI = 3; PL = 6)	7/3 (PI = 6; PL = nd)	10/10 (PI = 2; PL = 3)	9/9 (PI = 4; PL = 5)	5/4 (PI = 4; PL = 6)	6/6 (PI = 7; PL = 9)

FONTE: O autor (2020).

¹ Isolados pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID), UFPR, Curitiba-PR, Brasil.

² Valores médios de raiz quadrada \pm standard error, previamente transformados pela análise de Box-Cox para os frutos de caquizeiro. Para macieira e pereira, não foram necessárias transformações dos valores. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste LSD em $\alpha = 0,05$.

³ Número de frutos e folhas infectados/número de frutos e folhas com esporulação, em um total de 10 frutos e 10 folhas inoculados; nd = não determinado.

Os dados expressos na Tabela 10 podem ser observados por meio da Figura 13, onde é possível verificar as características dos sintomas de cada isolado/espécie em frutos de caquizeiro, macieira e pereira. As lesões nos frutos de caquizeiro apresentaram formatos cilíndricos a ovais, enegrecidas e necróticas, típicas da antracnose (FIGURA 13 A1-F1).

As lesões em frutos de macieira exibiram aspectos mais rugosos, de coloração parda a marrom, com depressão bem definida (aprofundada) (FIGURA 13 A2-F2). Em relação aos frutos de pereira, os sintomas observados foram de coloração parda a marrom, com bastante esporulação e, conforme foi mostrado na Tabela 6, o fruto inoculado com o isolado de *C. horii* não causou sintomas da doença. Para os frutos inoculados com os isolados de *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-06 e Col 33), foi observado, nas lesões, que, além da massa de conídios envoltos por mucilagem alaranjada, também apresentaram, ao redor do ponto de inoculação, pequenas pontuações negras endurecidas (FIGURA 13 A3 e D3). As esporulações foram mais evidentes para os isolados de *C. nymphaeae* (FIGURA 13 C3, E3 e F3).

FIGURA 13 - SINTOMAS DE *Colletotrichum* EM FRUTOS DE CAQUIZEIRO (PRIMEIRA FILEIRA), MACIEIRA (SEGUNDA FILEIRA) E PEREIRA (TERCEIRA FILEIRA), APÓS 10 DIAS DE INOCULAÇÃO, COM FERIMENTO



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A1-A3 *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-06) de caqui; B1-B3 *C. horii* (LEMIDPRDk 18-06) de caqui; C1-C3 *C. nymphaeae* (LEMIDPRDk 18-01) de caqui; D1-D3 *C. fructicola* (Col 33) de macieira; E1-E3 *C. nymphaeae* (Col 15); F1-F3 *C. nymphaeae* (PpCnPR 17-02) de pereira.

As lesões em folhas de caquizeiro apresentaram formatos irregulares, enegrecidos, com necroses se desenvolvendo intracelular, pelas nervuras da folha (FIGURA 14 A1-F1). Em macieira, foram observadas lesões com coloração inicial de

vermelho e, com o tempo, amarronzada, com desenvolvimento de pontuações necróticas (FIGURA 14 A2-F2). As lesões em folhas de pereira apresentaram colorações amarronzadas e, com o tempo, necróticas, com o desenvolvimento da doença pelas nervuras da folha, sendo translocadas pela nervura principal e se dispersando rapidamente pelas nervuras secundárias (FIGURA 14 A3-F3). Quanto às esporulações, foi possível observá-las tanto na face abaxial, quanto na face adaxial das folhas, independente do hospedeiro, bem como isolado/espécie.

FIGURA 14 - SINTOMAS DE *Colletotrichum* EM FOLHAS DE CAQUIZEIRO (PRIMEIRA FILEIRA), MACIEIRA (SEGUNDA FILEIRA) E PEREIRA (TERCEIRA FILEIRA), APÓS 12 DIAS DE INOCULAÇÃO, SEM FERIMENTO



FONTE: O autor (2020).

NOTA: A1-A3 *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-06) de caqui; B1-B3 *C. horii* (LEMIDPRDk 18-06) de caqui; C1-C3 *C. nymphaeae* (LEMIDPRDk 18-01) de caqui; D1-D3 *C. fructicola* (Col 33) de macieira; E1-E3 *C. nymphaeae* (Col 15); F1-F3 *C. nymphaeae* (PpCnPR 17-02) de pereira.

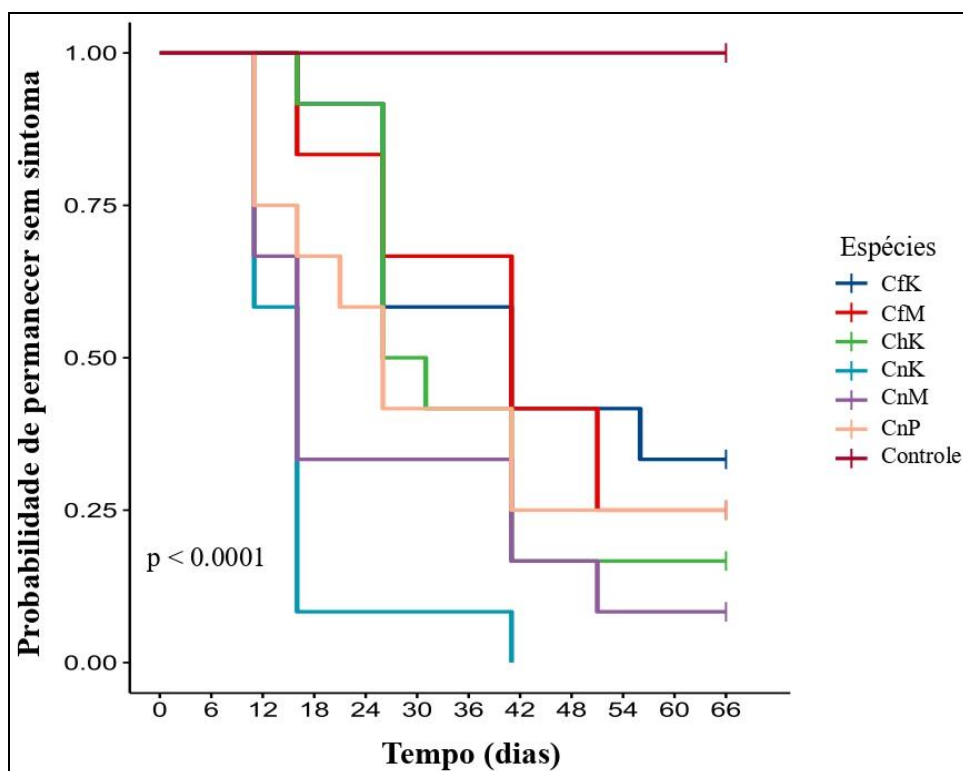
3.4.3 Patogenicidade comparativa de isolados obtidos de diferentes frutíferas, em ramos do ano (novos), em plantas de caqui (in vivo)

Todos os isolados foram capazes de causar doença em ramos novos de plantas de caqui, com probabilidade de sobrevida abaixo de 0,5. O valor da estatística de log-rank revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as curvas de Kaplan-Meier, indicando diferenças na função de sobrevivência entre os isolados testados ou no tempo de inoculação. Os tempos medianos (PI) para expressão dos sintomas da doença (e) estão demonstrados na Tabela 11.

Os isolados de *C. nymphaeae* de caqui (Cnk) e macieira (CnM) expressaram os sintomas da doença mais rápido do que os demais isolados. Mais

da metade dos ramos inoculados aos 16 dias após a inoculação ficaram abaixo de 0,50 para a probabilidade de ficarem sem sintomas. Além disso, aos 41 dias após a inoculação, todos os ramos inoculados de CnK expressaram os sintomas da doença, com probabilidade "0,00" de sobrevivência (FIGURA 15). Esse isolado causou sérios danos à planta de caqui, com alguns ramos sendo inteiramente necrosados e secos. Também foi observada uma desfolha nesses ramos infectados (FIGURA 16 F).

FIGURA 15 - ESTIMATIVAS DE KAPLAN-MEIER PARA AS FUNÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA, COMPARANDO ESPÉCIES DE *Colletotrichum* APÓS 66 DIAS DA INOCULAÇÃO, EM RAMOS DO ANO, EM PLANTAS DE CAQUIZEIRO (*D. kaki*), LOCALIZADAS EM UM POMAR EXPERIMENTAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR), CURITIBA-PR, BRASIL



FONTE: O autor (2020).

NOTA: CfK = *C. fructicola* (caqui); CfM = *C. fructicola* (macieira); ChK = *C. horii* (caqui); CnK = *C. nymphaeae* (caqui); CnM = *C. nymphaeae* (macieira); CnP = *C. nymphaeae* (pereira).

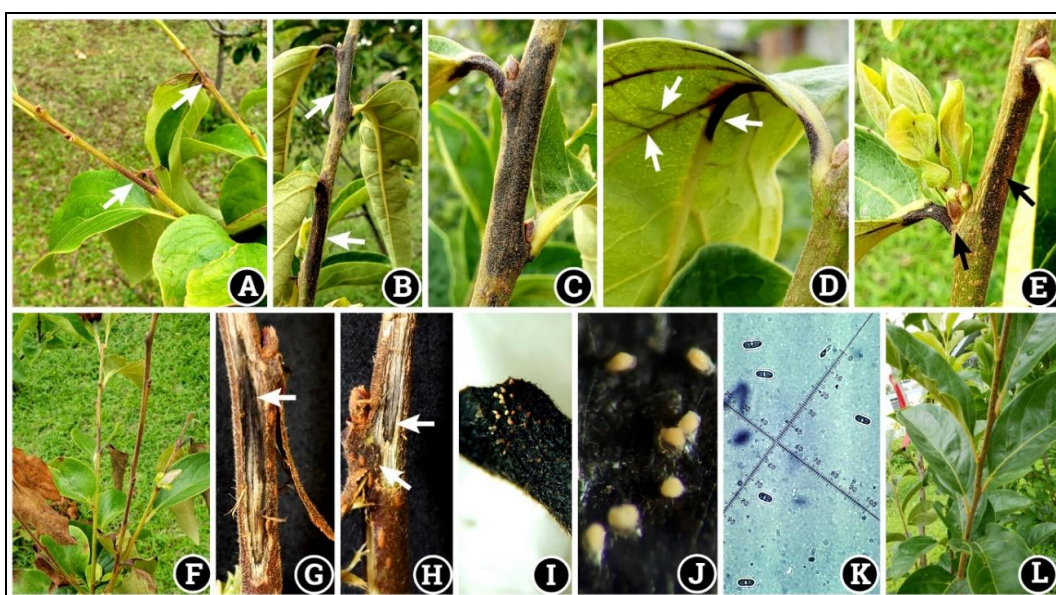
TABELA 11 - NÚMERO DE RAMOS COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE (e) E TEMPO MEDIANO PARA EXPRESSÃO DOS SINTOMAS (pi) EM PLANTAS DE CAQUIZEIRO

ESPÉCIES	ISOLADOS	HOSPEDEIRO ORIGINAL	n	e	pi
<i>C. fructicola</i>	SP18-06	Caqui	12	8	41
<i>C. horii</i>	PR18-06	Caqui	12	10	28,5
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-01	Caqui	12	12	16
<i>C. fructicola</i>	Col 33	Macieira	12	9	41
<i>C. nymphaeae</i>	Col 15	Macieira	12	11	16
<i>C. nymphaeae</i>	PR17-02	Pereira	12	9	26
log-rank				53,18	($p = 1 \times 10^{-9}$)

FONTE: O autor (2020).

No geral, os sintomas observados foram de manchas escuras, necróticas nos ramos novos. Com o tempo, foram observados alguns sintomas severos da doença, levando ao secamento dos ramos, impedindo, dessa forma, o desenvolvimento da planta (FIGURA 16). Como a inoculação foi por aspersão de conídios, provavelmente, alguns esporos atingiram folhas que estavam presentes nesses ramos avaliados, sendo observados alguns sintomas da doença nas folhas (FIGURA 16 D, E, I, J).

FIGURA 16 - SINTOMAS DE ANTRACNOSE CAUSADA POR ESPÉCIES DE *Colletotrichum*, EM RAMOS NOVOS DE PLANTAS DE CAQUIZEIRO 'FUYU'



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Sintomas iniciais com o escurecimento do tecido em ramos novos (A); desenvolvimento da doença com manchas necróticas (B); sintomas em ramo novo e na base do pecíolo da folha (C); sintomas na folha (D); sintomas na base do pecíolo da folha próxima à gema floral e se desenvolvendo no ramo (E); sintomas severos da doença, com ramos secos, causados pelo isolado *C. nymphaeae* de caquizeiro (F); corte transversal de ramos infectados, com necrose interna do tecido (G-H), e necrose próxima à gema floral (H); esporulação do patógeno no pecíolo da folha (I); visão da massa de conídios alaranjada em lupa (J); confirmação, em microscópio, do esporo assexual de *Colletotrichum* spp. (K); planta sadia (controle), inoculada com água (L).

4 DISCUSSÃO

A antracnose do caquizeiro pode ser causada por espécies do complexo *C. gloeosporioides* e do complexo *C. acutatum*, sendo este último presente apenas nos estados de São Paulo e Paraná. Treze isolados contendo as diferentes espécies foram capazes de causar antracnose no caquizeiro, diferindo em agressividade nos diferentes órgãos da planta inoculados. As espécies mostraram diferenças morfológicas e fisiológicas entre si. Além da patogenicidade no caquizeiro, foi comprovada a patogenicidade cruzada entre diferentes espécies de *Colletotrichum* quando inoculadas em frutos e folhas destacados de caquizeiro, macieira e pereira, e nos ramos novos em plantas de caquizeiro.

Independente do estado de produção de caquizeiro no território nacional, há predominância de espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*. Uma hipótese para este resultado pode ser devido ao fato de o principal agente causal (*C. horii*) da antracnose do caquizeiro no Brasil e no mundo fazer parte desse complexo (MAY DE MIO et al., 2015; HASSAN et al., 2018; DENG et al., 2019; WEIR; JHONSTON, 2010; XIE et al., 2010).

Outra hipótese, como tentativa de explicar a identificação dos dois complexos de *Colletotrichum* apenas nos estados de São Paulo e Paraná, é que isso pode ser devido aos diferentes órgãos vegetais coletados para esses estados, onde foram obtidos isolados de ramos novos, flores e frutos, e as maiores diversidades de espécies foram observadas nas fontes de inóculo primário da doença (flores e ramos novos), enquanto, para os frutos, houve predominância de isolados do complexo *C. gloeosporioides*. Esse fato pode explicar a frequência de apenas *C. gloeosporioides* para os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, devido todos os isolados serem provenientes de frutos.

Outro fator que pode estar correlacionado a esses resultados, é a abrangência de localidades dos isolados coletados nos estados de São Paulo e Paraná. No estado de Santa Catarina, foram provenientes de duas localidades e, no Rio Grande do Sul, foram de apenas uma localidade.

Na análise multigênica por inferência Bayesiana, as topologias das árvores filogenéticas foram semelhantes às relatadas pelos recentes estudos de reclassificação das espécies desse gênero (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012;

DAMM et al., 2012). Dentre os 18 isolados identificados, 7 isolados foram identificados como *C. horii*, 6 isolados de *C. fructicola*, 4 isolados de *C. nymphaeae* e 1 isolado de *C. melonis*. Diante da nova reclassificação filogenética, as espécies *C. horii* e *C. fructicola* pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*, enquanto as espécies *C. nymphaeae* e *C. melonis*, ao complexo *C. acutatum*.

A espécie *C. nymphaeae* foi, inicialmente, reportada como agente causal de mancha foliar em plantas aquáticas, *Nymphaea alba* e *Nuphar luteum* (VAN DER AA, 1978). Essa espécie foi também recentemente relatada como agente causal da antracnose do caquizeiro na Coréia do Sul (HASSAN; LEE; CHANG, 2019) e tem sido amplamente reportada como agente causal de frutíferas nos EUA (DOWLING et al., 2020). No Brasil, o *C. nymphaeae* é um dos principais agentes causais da mancha foliar de Glomerella em macieira (VELHO et al., 2015; MOREIRA; PERES; MAY DE MIO, 2019) e agente causal da antracnose em pereira e pessegueiro (MOREIRA et al., 2019b; MOREIRA; SILVA; MAY DE MIO, 2020).

Neste estudo, apenas um isolado foi identificado como *C. melonis*. Essa espécie parecia ser específica quanto ao seu hospedeiro (*Cucumis melo* - melão), em que foi, inicialmente, reportado, levando até à semelhança do nome do hospedeiro no patógeno (DAMM et al., 2012). No entanto, além do caquizeiro, também tem sido relatada para a cultura da macieira (VELHO et al., 2015; BRAGANÇA et al., 2016; MOREIRA; PERES; MAY DE MIO, 2019).

A espécie *C. fructicola* tem sido amplamente reportada em outras culturas, sendo uma das mais importantes dentro do complexo *C. gloeosporioides* para as espécies frutíferas (PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012; LIMA et al., 2013; JINGJING et al., 2014; ROCKENBACH et al., 2016; DOWLING et al., 2020). Essa espécie pode apresentar diferentes modos de vida, podendo ser endofíticos (MANAMGODA et al., 2013) e necrotróficos (SHARMA; SHENOY, 2014). Isso, de certa forma, explica a inespecificidade de hospedeiros, porém acaba dificultando obter um controle efetivo, visto que se trata de espécie com alta variabilidade genética. Devido à alta variabilidade intraespecífica existente para essa espécie, a análise filogenética apenas com o sequenciamento da região ITS-rDNA não é suficiente para separar essa espécie das demais, principalmente, entre as espécies vizinhas dentro do complexo, como as espécies *C. alienum* e *C. siamense* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Quando realizado o BLASTn com as sequências da

região ITS-rDNA, os isolados de *C. fructicola* apresentam ser *C. gloeosporioides lato sensu*, porém, quando realizada uma análise *multilocus*, com amplificação dos genes parciais GAPDH e TUB2, foi possível separar essa espécie e identificá-la corretamente.

A espécie *C. horii* é predominante como agente causal da antracnose do caquizeiro no mundo (ZHANG, 2008; XIE et al., 2010; WEIR; JHONSTON, 2010; KWON et al., 2013; MAY DE MIO et al., 2015; HASSAN et al., 2018; DENG et al., 2019). Na China, recentemente, foi observada diversidade genética entre populações de isolados de *C. horii* de diferentes regiões de cultivo, podendo, dessa forma, haver diferentes comportamentos dos isolados, por exemplo, no processo infeccioso, sendo requeridas diferentes estratégias de controle para populações de isolados de diferentes regiões (DENG et al., 2019). A análise filogenética *multilocus* revelou que apenas o sequenciamento da região ITS-rDNA é considerado muito informativo e suficiente para separação dessa espécie das demais dentro do complexo *C. gloeosporioides*, o que corrobora relatos de outros trabalhos (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; HASSAN et al., 2018).

No geral, a amplificação da região ITS-rDNA e dos genes parciais GAPDH e TUB2 permitiu separar essas espécies entre e dentro dos complexos de *Colletotrichum*, corroborando as análises de Sato, Moriwaki e Misawa (2013), Velho et al. (2015) e Vieira et al. (2020). A presença de espécies desses dois complexos vem sendo constantemente relatadas para outras frutíferas no Brasil (TOZZE-JÚNIOR et al., 2015; VELHO et al., 2015; BRAGANÇA et al., 2016; MOREIRA; PERES; MAY DE MIO, 2019; MOREIRA et al., 2019b; MOREIRA; SILVA; MAY DE MIO, 2020).

As características culturais informadas anteriormente para *C. horii*, *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. melonis* foram semelhantes às já descritas (PRIHASTUTI et al., 2009; XIE et al., 2010; WEIR; JHONSTON, 2010; VELHO et al., 2015; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012; BRAGANÇA et al., 2016).

As diferenças fenotípicas entre os isolados de *C. horii* e *C. fructicola* também foram relatadas em outros trabalhos (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; VELHO et al., 2015). Já para as espécies de *C. acutatum*, não foi observada essa alta variabilidade cultural entre os isolados, porém as colorações das colônias são bem distintas das observadas para as espécies do complexo *C. gloeosporioides*, sendo

possível induzir uma diferenciação por esse critério, devido esses isolados produzirem pigmentos alaranjados a rosados aparentes em meio de cultura BDA, que facilita essa diferenciação (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; DU et al., 2005).

A caracterização do formato dos conídios era um dos mais importantes critérios para os estudos taxonômicos de *Colletotrichum*, na qual era analisada a curvatura das extremidades dos conídios (SUTTON, 1980; VON ARX, 1957). Essa análise servia para distinguir isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*: os primeiros tinham a característica de formar conídios com extremidades pontiagudas e os segundos, com extremidades arredondadas (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; SIMMONDS, 1965).

Neste estudo, essas características possibilitaram distinguir os isolados entre os complexos, porém, entre as espécies do mesmo complexo, não foi útil para diferenciar, pois tanto *C. horii*, quanto *C. fructicola* apresentaram conídios cilíndricos, com as extremidades arredondadas, assim como *C. nymphaeae* e *C. melonis* apresentaram conídios fusiformes, com, pelo menos, uma extremidade pontiaguda, ou seja, apenas essa característica não foi suficiente para separar as espécies dentro do complexo, corroborando outros estudos (PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2010; VELHO et al., 2015; LÓPEZ-MORAL et al., 2017).

Quanto ao tamanho dos conídios, outro critério adotado nos estudos de caracterização de isolados de *Colletotrichum* (SUTTON, 1980; 1992), foi possível identificar, neste trabalho, três grupos distintos: o primeiro agrupa os isolados de *C. horii*, que revelaram comprimento (média de 21,05 μm) e volume (média de 745,81 μm^3) maior que os demais; seguido por um segundo grupo, com tamanhos intermediários (comp. 13,65 μm e vol. 469,61 μm^3), em que estão agrupados os isolados de *C. fructicola*; e um terceiro grupo com os isolados *C. nymphaeae* e *C. melonis*, os quais apresentaram tamanhos menores. No entanto, vale ressaltar que essas análises morfoculturais foram realizadas com meio de cultura altamente nutritivo (BDA), fornecendo condições ótimas para o desenvolvimento do fungo, diferente do que às vezes é encontrado na planta (LÓPEZ-MORAL et al., 2017). Devido a isso, pode haver variabilidade fenotípica dessas características. Os resultados desse critério de caracterização morfológica foram similares aos descritos em outros trabalhos que relataram essas espécies de *Colletotrichum* (XIE et al.,

2010; MAY DE MIO et al., 2015; DENG et al., 2019; VELHO et al, 2015; BRAGANÇA et al., 2016; DE CISNE et al., 2017).

Quanto à formação dos apressórios, foi notada maior taxa de melanização para os isolados de *C. fructicola* quando comparados com os demais, em ensaio *in vitro*. Para os fungos pertencente ao gênero *Colletotrichum*, a presença de melanina nos apressórios é fundamental para o processo de patogênese (THINES; WEBER; TALBOT, 2000), visto que essas estruturas dos patógenos serão responsáveis por penetrar diretamente na cutícula do tecido dos hospedeiro, sendo uma forma rápida de esses organismos obterem o nutriente do hospedeiro (O'CONNELL et al., 2000; WOLOSHUK; SISLER, 1982). Diante disso, esse ensaio pode servir como alternativa para seleção prévia de populações de isolados de *Colletotrichum* de caquizeiro, para diferenciação das espécies do complexo *C. gloeosporioides* (*C. horii* e *C. fructicola*).

Os estudos para o conhecimento da temperatura ótima do crescimento micelial e da germinação de conídios são importantes variáveis a serem analisadas para compreensão das epidemias de doenças de plantas. Para o caquizeiro, foi provado que o aumento da temperatura em conjunto com períodos chuvosos é a condição favorável para o desenvolvimento do patógeno (ZHANG, 2008; KWON et al., 2013). A temperatura ótima para o crescimento micelial é de, aproximadamente, 25°C para *C. horii* (XIE et al., 2010; MAY DE MIO et al., 2015), corroborando os resultados estimados no presente estudo para essa espécie.

Quanto à análise das amplitudes térmicas e estimativas das temperaturas ótimas para crescimento micelial e germinação de conídios, não houve grande diferença entre as espécies de *Colletotrichum* de caquizeiro, sendo observado que, em condições de 10 a 35°C, os isolados podem se desenvolver, porém com melhores condições entre temperaturas de 23 a 26°C. Entretanto, os isolados de *C. gloeosporioides* revelaram crescimentos miceliais maiores e mais rápidas nas temperaturas ótimas estimadas, quando comparados com os isolados de *C. acutatum*. Deste modo, ao conhecer as condições ambientais que favorecem a doença é possível adotar estratégias de manejo integrado para interferir no ciclo de vida dos patógenos impedindo que este seja completado e/ou de forma a reduzir o inóculo presente na área. Recomenda-se o manejo preventivo com o intuito de evitar a disseminação do inóculo primário.

Essas diferenças do crescimento micelial entre os complexos de *Colletotrichum* também foram relatadas em isolados de diferentes frutíferas, visto que os isolados de *C. acutatum* tiveram crescimento mais lento que os isolados do complexo *C. gloeosporioides* (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; DOWLING et al., 2020). Vinnere (2004) considerou essa característica como estável e útil para distinção das espécies entre esses complexos. Assim como observado para o caqui, foi também relatado em macieira, em que os isolados de *C. nymphaeae* e *C. melonis* revelaram crescimento mais lento que os isolados das espécies *C. fructicola*, *C. theobromicola* e *C. karstii* (VELHO et al., 2015). Em morango, foi reportada tolerância para temperaturas altas em isolados de *C. fructicola* (a temperatura ótima para o crescimento micelial foi de 28°C). Diferentemente do que foi observado para *Colletotrichum* spp. de caqui, para o morango, foi relatada diferença entre as espécies dentro do mesmo complexo, por exemplo, a espécie *C. siamense* foi a que tolerou temperaturas mais altas (superiores a 36°C) quando comparada com *C. fructicola* e *C. aenigma* (ZHANG et al., 2019).

As diferenças entre espécies dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* quanto à especificidade do tecido e à agressividade foram relatadas e são mais conhecidas (UREÑA-PADILLA et al., 2002; GONZÁLEZ; SUTTON; CORELL, 2006; JOHNSON, 2018). Apesar disso, recentemente, há alguns estudos que demonstram diferenças entre as agressividades de espécies pertencentes ao mesmo complexo, como os isolados de *C. siamense*, que causaram maiores lesões em frutos de caqui (com fermento) do que os isolados de *C. horii* (HASSAN et al., 2018). Para macieira, os isolados de *C. fioriniae* causaram lesões mais severas do que os isolados de *C. nymphaeae* (MUNIR et al., 2016). Por sua vez, em morango, a espécie *C. nymphaeae* foi mais agressiva que a espécie *C. fioriniae* (WANG et al., 2019). Em pessegueiro, foi relatada diferença de agressividade para as espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, no qual os isolados de *C. fructicola* foram mais agressivos que os isolados de *C. siamense* (HU; GRABKE; SCHNABEL, 2015).

Quanto às diferenças de agressividade entre os isolados em tecidos com ou sem fermento, isso pode estar associado à adaptabilidade de cada isolado ao tecido do hospedeiro. Como já é conhecido, os fermentos facilitam o sucesso da infecção causada por *Colletotrichum* e, conseqüentemente, a ocorrência da doença (DENARDI;

BERTON; SPENGLER, 2003; PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012). Além disso, alguns fungos produzem mais enzimas extracelulares, como a cutinase, que são responsáveis por degradar a cutícula e a epiderme para entrar no tecido da planta (LIAO et al., 2012), o que pode facilitar a infecção em tecidos sem ferimentos. Diante disso, levanta-se a hipótese de que esses isolados de caquiizeiro possam apresentar diferentes habilidades para produção dessas enzimas. É um indicativo de que os isolados de *C. horii* têm maior produção, visto que são mais agressivos quando inoculados em tecidos sem ferimento, mas, quando ocorre ferimento, os isolados de *C. fructicola* revelam ser mais agressivos. Isso foi observado para frutos de pera, onde o ferimento pode ter causado uma quebra da infecção quiescente e favorecido a infecção do *C. fructicola* (JINGJING et al., 2014). Portanto, a verificação bioquímica dessas enzimas no processo infeccioso das diferentes espécies de *Colletotrichum*, causadoras da antracnose do caquiizeiro, é uma lacuna a ser estudada em trabalhos futuros.

Neste estudo, também foram relatadas infecções em outros hospedeiros, como macieira e pereira. Todos os isolados avaliados foram capazes de causar doenças tanto no hospedeiro original, quanto em outro avaliado, indicando, assim, possível infecção cruzada entre essas espécies e hospedeiros, exceto o isolado de *C. horii* (LEMIDPRDk 18-06 - ChK), que não causou doença em frutos de pera. Vários estudos têm demonstrado ausência de especificidade de *Colletotrichum* ao hospedeiro (PERES et al., 2002; MACKENZIE et al., 2009; LAKSHMI; REDDY; PRASAD, 2011; PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012; PENG et al., 2013; BARONCELLI et al., 2015; BRAGANÇA et al., 2016). Infecção de *C. horii* em frutos de banana foi relatada (XIE et al., 2010) e pequenas lesões da doença em pimentões e abóbora, quando inoculadas *ex vivo*, mas, no campo, não foi responsável por causar doença (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; HASSAN et al., 2018). O conhecimento da habilidade de patogenicidade cruzada dessas espécies é importante para investigar o potencial de gama de hospedeiro e, consequentemente, adotar estratégias de manejo (PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012), bem como compreender estudos epidemiológicos espaciais, visto que essas espécies frutíferas, muitas vezes, estão sendo produzidas nas mesmas áreas e, possivelmente, podem servir como fontes de inóculos para epidemias poliéticas.

Para a patogenicidade comparativa das espécies em plantas de caquizeiro, independente do hospedeiro original, todos os isolados foram capazes de causar doença em ramos novos de caquizeiro, tornando o resultado preocupante, pois esse tecido da planta tem sido relatado como importante fonte de inóculo primário para as epidemias (DOLINSKI; GORAYEB; MAY DE MIO, 2015; ASANO; HIRAYAMA, 2019). Diante da alta variabilidade genética dessas espécies, o manejo pode se tornar complexo, visto que são necessárias estratégias de controle para cada indivíduo (DOWLING et al., 2020). Neste ensaio, o isolado de *C. nymphaeae* (LEMIDPRDk 18-01 - CnK) de caquizeiro foi o mais agressivo em ramos novos inoculados, levando à incidência total da doença nos ramos inoculados (100%). Uma hipótese é a de que esse resultado pode ser devido às condições climáticas no momento do experimento, já que foram inoculados com temperaturas em torno de 23°C e, logo após a inoculação, ocorreu uma variação térmica nas semanas seguintes, com temperaturas abaixo de 20°C em alguns dias. Isso pode ter favorecido o isolado dessa espécie se desenvolver mais rapidamente nessas condições do que os demais isolados, que preferem temperaturas mais altas. A ocorrência do aumento da temperatura foi crucial para a expressão dos sintomas nesses tecidos, que, provavelmente, já estavam sendo infectados. Por esse patógeno ter característica de produzir bastante massa de conídios (observação pessoal) – também observado em abundância nas lesões causadas por *C. nymphaeae*, em macieira (VELHO et al., 2015) –, ele pode ter contribuído para uma infecção explosiva, visto que os danos finais foram bastante severos.

Este trabalho evidencia novas informações etiológicas a respeito dos agentes causais da antracnose do caquizeiro no Brasil. Além disso, compara as espécies *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. melonis*, contrastando variáveis epidemiológicas importantes para melhor compreensão desse patossistema. Nesse sentido, este trabalho relata a existência de diversidade genética entre os isolados de *Colletotrichum*, diferenças de agressividade em diferentes tecidos vegetais, conhecimento das temperaturas favoráveis para o crescimento micelial e germinação dos conídios (*in vitro*), além de revelar o primeiro relato de patogenicidade cruzada entre espécies de *Colletotrichum* de caquizeiro, macieira e pereira. A identificação correta das espécies e o conhecimento da patogenicidade e agressividade em diferentes tecidos da planta são essenciais para o manejo correto

da doença em campo. A partir deste trabalho, recomenda-se estudos da sensibilidade desses isolados aos fungicidas, devido ao fato de espécies de *Colletotrichum* apresentarem diferentes níveis de toxicidade inerente a fungicidas. Além disso, as informações geradas neste capítulo serão vantajosas para futuros trabalhos com base nos estudos epidemiológicos e no manejo da doença, considerando-se a diversidade de clima e espécies plantadas nos diferentes pomares de frutíferas das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

5 CONCLUSÕES

Foram identificadas espécies dos complexos *C. gloeosporioides* (*C. horii* e *C. fructicola*) e *C. acutatum* (*C. nymphaeae* e *C. melonis*) como agentes causais da antrnose do caquizeiro no Brasil. O complexo *C. gloeosporioides* foi predominante nas quatro regiões produtoras avaliadas.

Houve diferenças na agressividade entre os isolados de *Colletotrichum* de caquizeiro, em diferentes órgãos inoculados da planta.

Infecção cruzada entre espécies de *Colletotrichum* de caquizeiro, macieira e pereira puderam ocorrer, exceto o isolado de *C. horii*, que não causou doença em frutos de pereira destacados.

Espécies dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, de caquizeiro, variaram pouco quanto a temperatura ótima para o crescimento micelial e germinação de conídios

CAPÍTULO II
SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., DE FLORES E RAMOS
DE CAQUIZEIRO, A DIFERENTES GRUPOS QUÍMICOS E EFICIÊNCIA NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE

RESUMO

O controle da antracnose do caqui, causada por espécies de *Colletotrichum*, é realizado por meio de manejo integrado, com métodos culturais, nutricionais e, principalmente, químicos. Atualmente, a maioria dos fungicidas sistêmicos são compostos por ingredientes ativos dos Inibidores da Quinona externa (IQe) e dos Inibidores da DesMetilação (IDM), os quais apresentam riscos alto e médio, respectivamente, para seleção do fungo à resistência. Por essa razão, estudos de sensibilidade e testes de eficiência dos fungicidas são necessários para investigar os níveis de toxicidade inerente dos fungos aos fungicidas. Os objetivos deste capítulo foram: (i) investigar os níveis de sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de ramos e flores, aos principais ingredientes ativos registrados para a cultura, bem como testar outros ingredientes ativos não registrados; (ii) avaliar o risco de ocorrência de sensibilidade cruzada do patógeno entre os produtos testados; e (iii) testar a eficiência, em frutos imaturos e maduros destacados, de produtos registrados para controle de doenças no caqui. Este trabalho mostrou diferenças entre as espécies de *Colletotrichum* quanto aos níveis de sensibilidade aos ingredientes ativos avaliados. Os valores estimados de CE₅₀ para os ingredientes ativos não registrados podem servir como estudos de linha-base. Além disso, diferentes riscos de ocorrência de sensibilidade cruzada foram observados, sendo alto risco para os ingredientes ativos dos IQe's, médio para os IDM's, multisítio e baixo para os ISDH's, enquanto, para os AP's, foi observada correlação negativa. Em relação aos testes de eficiência dos fungicidas, foi comprovada a sua eficiência, porém houve diferenças no controle da doença entre os ensaios de frutos imaturos e maduros. No geral, as populações de patógenos de ramos e flores foram sensíveis aos ingredientes ativos avaliados. Os ingredientes ativos dos ISDH's revelaram ser eficientes no controle de *Colletotrichum*, no ensaio *in vitro*. Fungicidas à base de difenoconazol e com IQe e IDM (azoxistrobina + difenoconazol e trifloxistrobina + tebuconazol), na formulação, foram os mais eficazes para controle da antracnose.

Palavras-chave: Controle químico. Fungicidas. Sensibilidade reduzida. Sensibilidade cruzada.

ABSTRACT

The control of persimmon anthracnose, caused by species of *Colletotrichum*, is held by integrated management, with crop, nutritional and mostly chemical methods. Currently, most systemic fungicides are composed by active ingredients of Quinone outside Inhibitors (IQe) and of DeMethylation Inhibitors (IDM), which present high and medium risks, respectively, in the fungus selection to resistance. By this reason, sensitivity studies and efficacy tests are necessary to research the toxicity levels associated in the fungus to the fungicide. The purposes of this section were: (i) to research the sensitivity levels of *Colletotrichum* ssp. isolates, obtained from twigs and flowers to the main active ingredients registered to the crop, as well as test other active ingredients not registered; (ii) to evaluate the risk of the occurrence of cross-sensitivity of pathogen between the tested fungicide; and (ii) to test the efficacy, in ripe and unripe fruits detached, of registered fungicide, to the disease control in persimmon. This study revealed differences between the *Colletotrichum* species regarding the sensitivity levels to the active ingredients tested. The estimate values of EC₅₀ to the active ingredients not registered can serve as base-line studies. Besides that, difference risks of occurrence of cross-sensitivity were observed, with high risk to the active ingredients of IOe's, medium risk to the IDM's, multisite and low risk to the ISDH's, whereas to the AP's was observed a negative correlation. Regarding the efficacy assays, its efficacy was proven, although differences were observed in the disease control between the assays with ripe and unripe fruits. Overall, the pathogen population of twigs and flowers, were sensitive to the tested active ingredients. The active ingredients of ISDH's reveled to be effective in *Colletotrichum* control in assays *in vitro*. Fungicides based on difenoconazole and with IQe and IDM (azoxystrobin + difenoconazole e trifloxystrobin+ tebuconazole) in its formula, were more effective to control anthracnose.

Keywords: Chemical control. Fungicide. Reduced sensitivity. Cross-sensitivity.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o caquizeiro era considerado planta rústica, que não exigia muitos cuidados culturais ou tratamentos fitossanitários para obtenção de altas produtividades. Entretanto, são crescentes os relatos de produtores e técnicos preocupados com doenças no geral e, em especial, com a antracnose. A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., é a principal doença do caquizeiro, podendo infectar diferentes partes da planta como: flores, ramos, frutos e folhas, causando sérios prejuízos, devido, principalmente, aos danos causados aos frutos e à queda prematura dos frutos, que pode ocorrer em áreas com alta presença de inóculo (BLOOD; ROZWALKA; MAY DE MIO, 2015; DOLINSKI et al., 2016).

A principal estratégia para o controle dessa doença é a combinação dos métodos culturais, nutricionais e químicos, desde as correções do solo anteriormente à implantação dos pomares e adubação de cobertura ao longo do desenvolvimento da planta. Além disto, a retirada de partes doentes da planta, como ramos ladrões infectados, e a redução do porte das plantas também são medidas importantes. Durante o desenvolvimento do ciclo produtivo, recomenda-se a retirada contínua dos ramos e frutos sintomáticos. Essas medidas visam reduzir a fonte de inóculo e a obtenção de maior eficiência dos tratamentos de inverno e/ou demais manejos (podas e pulverizações). Associado a essas técnicas, o controle químico é essencial para manutenção da boa produtividade do caquizeiro (DENG et al., 2019). No entanto, poucos produtos estão registrados para a cultura e pouco se sabe sobre as eficiências desses produtos e a sensibilidade de diferentes isolados de *Colletotrichum* aos fungicidas.

Para o controle químico de doenças do caquizeiro no Brasil, a maioria dos fungicidas sistêmicos são compostos por ingredientes ativos de sítio-específico dos grupos químicos dos Inibidores da Quinona externa (IQe – FRAC#11) e dos Inibidores da DesMetilação (IDM – FRAC#3) (AGROFIT, 2020; FRAC, 2020). Os fungicidas do grupo dos IQe's têm, como modo de ação, a interferência dos processos de produção de energia (ATP) durante a respiração mitocondrial, que está vinculada à ligação do sítio da quinona-oxidase (Qo), presente no gene citocromo *b* (*cyt b*). Desta forma, vai bloquear a transferência de elétrons entre o citocromo *b* e o *c1*, que estão situados internamente, na membrana mitocondrial dos fungos (complexo III),

impedindo a formação de ATP (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010; LEADBEATER, 2012). Já os fungicidas do grupo dos IDM's têm, como mecanismo de ação, atuarem na inibição da biossíntese de esterol, principalmente no ergosterol, estrutura responsável pela manutenção da integridade da membrana e da rota sintética dos fungos. A inibição desse processo pode interferir na disponibilidade de ergosterol e resultar na ruptura da membrana (OLIVER; HEWITT, 2014). Entretanto, esses fungicidas apresentam riscos de médio a alto para a seleção da resistência do fungo aos fungicidas, e isso pode implicar uma falha do controle no campo, caso não manejados corretamente (FRAC, 2019).

A redução da sensibilidade de fungos aos fungicidas, ocorre por meio de mutações nos sítio-alvos dos fungicidas, por exemplo, para os fungicidas do grupo químico dos IQe, que são, tipicamente, causados por mutações que ocorrem no gene citocromo *b* (*cytb*) (MA; MICHAILIDES, 2005), sendo mais conhecidas as mudanças de glicina para alanina, no códon 143 (G143A); de fenilalanina para leucina, no códon 129 (F129L); e de glicina para arginina, no códon 137 (G137R). Dessas mutações, a G143A é considerada a mais importante, devido conferir alta resistência e, geralmente, ter caráter de resistência qualitativa (FISHER et al., 2004; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008; SIEROTZKI et al., 2007). Os fungicidas do grupo químico dos IDM têm, por natureza, apresentarem resistência do tipo quantitativa, a qual é poligênica, ou seja, resultante de uma interação de vários genes, que vão desempenhar diferentes níveis de resistência (LUPETTI et al., 2002). O mecanismo de resistência para esses fungicidas ocorre com mutações no gene 14 α – desmetilase (CYP51) ou por mecanismos alternativos, como a overexpressão gênica (MA; MICHAILIDES, 2005), porém nem sempre resulta em substituições dos aminoácidos ligados aos fenótipos de resistência (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007).

Para uma população de isolados na qual não há evidências de genótipos de resistência, em estudos de monitoramento da sensibilidade do fungo a fungicida, o termo "sensibilidade reduzida - SR" é muito utilizado (CHEN et al., 2016; PEREIRA et al., 2017). Para definir se a população de isolado está sofrendo alterações na sensibilidade ao longo do tempo, esta precisa ser comparada com uma população linha-base. O termo linha-base, do inglês *baseline*, representa a variação da sensibilidade natural ou inicial em populações de patógenos, antes de serem

expostos aos fungicidas (RUSSELL, 2004). Ensaio *in vitro*, com doses-respostas, serão utilizados para determinar a concentração efetiva capaz de inibir 50% (CE₅₀) do diâmetro micelial ou da germinação de conídios do fungo e esses valores são importantes para estabelecer estudos linha-base (caso não tenha), ou vão servir para comparar populações de diferentes isolados e safras, e verificar se estão ocorrendo mudanças da sensibilidade do patógeno ao fungicida (RUSSELL, 2004). Caso a mudança de sensibilidade seja comprovada, dependendo dos mecanismos de resistências de cada fungicida, pode ocorrer falha do controle da doença no campo. Com os valores de CE₅₀, também é possível avaliar o risco de ocorrência da sensibilidade cruzada, que se define quando os isolados do patógeno selecionam resistência ou sensibilidade reduzida a mais de um fungicida com o mesmo modo de ação, de forma correlacionada (BRENT; HOLLOMON, 2007). Além dos ensaios *in vitro* para estudo de sensibilidade, a eficiência de produtos pode ser validada com testes em plantas ou frutos tratados com a dose recomendada para o produtor, sendo relevantes estudos para investigação de possíveis falhas do controle no campo (GHINI; KIMATI, 2000).

Recentemente, foram relatados novos agentes causais de antracnose do caquizeiro no Brasil (CARRARO et al., 2019) e no mundo (WANG et al., 2010; HASSAN et al., 2018; HASSAN; LEE; CHANG, 2019), deixando clara a necessidade de estudos que relacionem não só a sensibilidade aos fungicidas, mas também que falem sobre qual espécie ou, pelo menos, qual complexo de *Colletotrichum* está presente na região monitorada. O conhecimento da variabilidade genética do patógeno é importante para se adotar uma estratégia adequada para o controle da doença, pois os fungos têm a capacidade de se multiplicar e gerar indivíduos que serão favorecidos na seleção de linhagens, possibilitando o surgimento de populações resistentes de forma aleatória ou induzida (TOZZE JUNIOR; MELLO; MASSOLA JUNIOR, 2006). O inóculo de *Colletotrichum* na cultura do caquizeiro sobrevive, assim como a maioria desse gênero, em frutíferas, na própria planta, de um ciclo para outro. Dessa forma, o inóculo que inicia o ciclo é o que está presente em ramos novos e flores, no início da primavera. Sendo assim, monitorar a sensibilidade de isolados a fungicidas provenientes do inóculo primário pode ser bom indicativo de como a população do patógeno está no início da safra.

Diante desse contexto, os objetivos deste capítulo foram: i) investigar os níveis de sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de ramos e flores, aos principais ingredientes ativos registrados para a cultura, bem como testar outros ingredientes ativos não registrados; ii) avaliar o risco de ocorrência de sensibilidade cruzada do patógeno entre os produtos testados; e iii) testar a eficiência, em frutos imaturos e maduros destacados, de produtos registrados para controle de doenças no caquizeiro.

2 METODOLOGIA

2.1 ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

Os isolados foram selecionados a partir de uma população de 57 isolados do estado de São Paulo e do Paraná, da safra 2017/18, obtidos de ramos e flores de caquizeiro, de duas regiões: Região Metropolitana de Curitiba, no Paraná, e Região de Itapetininga (RI), em São Paulo. Diante disso, foram selecionados 16 isolados que representassem diferentes fenótipos por meio da dose discriminatória para azoxistrobina (1 µg/mL) e tebuconazol (0,3 µg/mL) (TABELA 1), os quais foram identificados por espécie de *Colletotrichum*, no Capítulo 1 desta dissertação. Dentre a população coletada na safra, selecionou-se uma amostra de 10 isolados do Paraná, sendo 5 do complexo *C. acutatum* e 5 do complexo *C. gloeosporioides*, e 6 isolados de São Paulo, todos do complexo *C. gloeosporioides*, seguindo a classificação por complexo que estava finalizada no momento da escolha da amostra. As duas regiões escolhidas para coleta dos isolados têm médias climáticas mensais semelhantes. Considerando Curitiba como ponto de referência para a região metropolitana, as cidades da RI são distantes em, aproximadamente, 150 km da capital do Paraná, distância relativamente curta, o que, de certa forma, explica as mesmas condições climáticas de cultivo. Os isolados foram obtidos de ramos novos e de flores, no intuito de caracterizar isolados provenientes do primeiro inóculo produzido na safra.

TABELA 1 - ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., DA SAFRA 2017/18, UTILIZADOS NESTE TRABALHO, DE ACORDO COM CÓDIGO (LEMID), ESPÉCIE, CULTIVAR, ÓRGÃO VEGETAL, LOCALIZAÇÃO (MESORREGIÃO, ESTADOS), SISTEMA DE CULTIVO

continua

ISOLADOS LEMID ^{DDk}	ESPÉCIES	CULTIVAR	ÓRGÃO VEGETAL ISOLADO	MESORREGIÃO/ ESTADO ¹	SISTEMA DE PRODUÇÃO
PR 18-01	<i>C. nymphaeae</i>	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico
PR 18-02	<i>C. nymphaeae</i>	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico
PR 18-04	<i>C. nymphaeae</i>	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico
PR 18-07	<i>C. nymphaeae</i>	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico
PR 18-11	<i>C. melonis</i>	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Convencional
PR 18-03	<i>C. horii</i>	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico
PR 18-06	<i>C. horii</i>	Fuyu	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico
PR 18-08	<i>C. horii</i>	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Convencional
PR 18-09	<i>C. horii</i>	Kakimel	Flor	RMC/PR	Orgânico
PR 18-10	<i>C. horii</i>	Kakimel	Ramo novo	RMC/PR	Orgânico
SP 18-01	<i>C. horii</i>	Fuyu	Ramo novo	RI/SP	Convencional

TABELA 1 - ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., DA SAFRA 2017/18, UTILIZADOS NESTE TRABALHO, DE ACORDO COM CÓDIGO (LEMID), ESPÉCIE, CULTIVAR, ÓRGÃO VEGETAL, LOCALIZAÇÃO (MESORREGIÃO, ESTADOS), SISTEMA DE CULTIVO

ISOLADOS LEMID ^{kk}	ESPÉCIES	CULTIVAR	ÓRGÃO VEGETAL ISOLADO	MESORREGIÃO/ ESTADO ¹	conclusão
					SISTEMA DE PRODUÇÃO
SP 18-02	<i>C. fructicola</i>	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional
SP 18-03	<i>C. fructicola</i>	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional
SP 18-04	<i>C. fructicola</i>	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional
SP 18-05	<i>C. fructicola</i>	Fuyu	Ramo novo	RI/SP	Convencional
SP 18-06	<i>C. fructicola</i>	Fuyu	Flor	RI/SP	Convencional

FONTE: O autor (2020).

¹ Siglas das mesorregiões e estados: RMC – Região Metropolitana de Curitiba dos estados do Paraná, PR – Paraná; RI – Região de Itapetininga, SP - São Paulo.

Para a dose discriminatória, os isolados foram crescidos em meio BDA e incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h. Após o sétimo dia, para cada isolado, discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram retirados da borda das colônias e transferidos para novas placas de meio BDA. Foram preparados três diferentes meios de cultura BDA: i) placas sem o acréscimo de fungicida, que serviram como controle (testemunha); ii) placas acrescidas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobina (Amistar WG®, 500 g kg⁻¹, Syngenta Ltda.) e, iii) placas com $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tebuconazol (Folicur®, 200 g L⁻¹, Bayer S. A.). Em cada placa, foram transferidos quatro discos de micélio pertencentes a diferentes isolados, sendo consideradas quatro repetições por isolado, ou seja, cada combinação de quatro isolados continha quatro placas diferentes, sendo essas placas consideradas as repetições. Em seguida, as placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por cinco dias. O diâmetro médio da colônia (DC) para cada isolado foi obtido a partir de duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia, com auxílio de um paquímetro digital. A percentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi obtida usando a relação $\% \text{ ICM} = [(C - T) / C] \times 100$, onde: C representa o diâmetro médio da colônia sem a adição de fungicida (testemunha) e T é a média do diâmetro das colônias com os fungicidas (YOSHIMURA et al., 2004). Os isolados foram classificados quanto ao fenótipo em: sensíveis (S) = $\text{ICM} > 30\%$; e; sensibilidade reduzida (SR) = $\text{ICM} < 30\%$.

2.2 SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum* spp. AOS FUNGICIDAS (IN VITRO)

A sensibilidade de *Colletotrichum* spp. foi determinada com cálculo da CE₅₀ pelo método de gradiente em espiral (termo em inglês "*Spiral gradient dilution*" ou "*Spiral plater*").

Para a determinação da CE₅₀, foram analisados dez ingredientes ativos (i.a.), com diferentes modos de ação, bem como grupos químicos distintos, totalizando seis grupos químicos, sendo: **Qol - fungicidas** (Inibidores extracelulares de Quinona, FRAC#11), avaliou-se azoxistrobina (Abound®; Syngenta Crop Protection, Inc. Greensboro, NC, EUA) e trifloxistrobina (Gem®; Bayer CropScience, Research Triangle PK, EUA); **ISDH** (Inibidores da succinato-desidrogenase, FRAC#7), benzovindiflupir (Aprovia®; Syngenta, Greensboro, NC, EUA) e pentiopirade (Fontelis®; DuPont, Wilmington, EUA); **DMI - fungicidas** (inibidores da desmetilação, FRAC#3), difenoconazol (Score®; Syngenta Crop Protection, Monthey, Swiss) e tebuconazol (Folicur®; Bayer CropScience, Missouri, EUA); **AP – fungicida** (Anilinopirimidina, FRAC#9), ciprodinil (Vangard® WG; Syngenta, Greensboro, NC, EUA) e pirimetanil (Scala®; Bayer CropScience, Research Triangle PK, EUA); também foram testados os fungicidas multisítios do grupo **Ftalimida** (FRAC#M04), com o fungicida Captan® 80 WDG (i.a. Captana; UPL NA Inc.) e o grupo **Cloronitrila** - sub-grupo: fitalonitrila (FRAC#M05) com o fungicida Bravo® 500 (i.a. Clorotalonil; Syngenta UK Limited). Atualmente, apenas os ingredientes ativos dos Qol's, DMI's, AP's (pirimetanil) testados neste ensaio, estão registrados para a cultura do caquizeiro no Brasil (AGROFIT, 2020).

Para o preparo das soluções estoques de cada fungicida, os fungicidas puros (*technical grade*): pentiopirade (i.a. 99,5%), benzovindiflupir (i.a. 97%) e captana (i.a. 77,8%) foram diluídos em acetona; e os produtos comerciais: azoxistrobina (i.a. 24,95%), trifloxistrobina (i.a. 48,60%), difenoconazol (i.a. 23,34%), tebuconazol (i.a. 38,7%), ciprodinil (i.a. 75%), pirimetanil (i.a. 54,6%) e clorotalonil (i.a. 71,9%), foram diluídos com água destilada autoclavada. No total, foram preparados 10 mL de solução estoque nas concentrações de 10.000, 1.000, 100 e 10 ppm para os produtos dos grupos químicos Qol's e DMI's, enquanto, para os outros fungicidas, as diluições foram realizadas a partir de 1.000, 100 e 10 ppm.

A avaliação da sensibilidade de *Colletotrichum* spp. aos fungicidas foi realizada por crescimento micelial, pelo método de diluição em gradiente, conforme proposto por Förster, Kanetis e Adaskaveg (2004). Os 16 isolados que foram utilizados neste ensaio cresceram em meio BDA, por 7 dias, à incubação de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 12 h. Após os crescimentos das colônias dos isolados, 5 mL de água destilada autoclavada foram transferidos para as placas e, com uma alça de drigalski, obteve-se uma concentração de esporos. Em seguida, 1 mL dessa suspensão foi transferido para novas placas BDA, com tiras de madeira (5 cm de comprimento x 0,5 cm de largura) autoclavadas e dispostas, novamente, em incubação a 25°C, para o crescimento fúngico sobre as tiras de madeira (FIGURA 1 A1-A2).

Os preparos das placas (150 mm) com os fungicidas foram realizados com dois tipos de meio de cultura: BDA e YBA (*Yeast Bacto Acetate*), sendo transferidos 50 mL desses meios em cada placa. Os fungicidas dos grupos químicos dos ISDH's e IQe's foram preparados em placas com YBA, conforme analisados em outros trabalhos, nos quais esse tipo de meio demonstrou melhores resultados para os produtos que atuam na respiração do patógeno (STAMMLER; SPEAKMAN, 2006; HU et al., 2011; ISHII et al., 2016). Para os ingredientes ativos do grupo IQe, foram acrescidos, no meio de cultura, 100 mg/mL de ácido salicilhidroxâmico (SHAM; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), a fim de suprimir a via alternativa da respiração (via AOX); enquanto os demais fungicidas foram preparados em placas com meio BDA. Para cada meio de cultura/isolado houve um controle com placas sem fungicida.

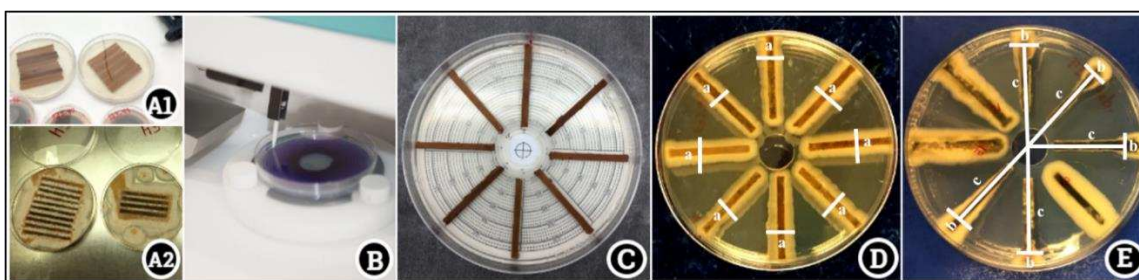
Das soluções estoques dos fungicidas preparadas previamente, foram transferidos 54,3 µL para a distribuição dos fungicidas na superfície das placas, formando diferentes gradientes de concentrações, por meio de aplicador em espiral (Eddy Jet 2 Spiral Plater, Neu-tec Group Inc.), o qual distribui os fungicidas de modo exponencial, sendo as maiores concentrações no centro da placa e as menores concentrações nas bordas da placa (FIGURA 1 B). Subsequentemente, as placas foram dispostas em temperatura ambiente, por 5 horas, para incorporação dos fungicidas. Passado esse tempo, com um perfurador (Ø 18 mm) previamente flambado, removeu-se o meio do centro das placas para delimitar o crescimento fúngico. Após isso, foram removidas as tiras de madeiras com crescimento micelial de 7 dias de incubação das placas de BDA e essas tiras foram transferidas com o micélio voltado para as placas com os fungicidas (FIGURA 1 C). Cada placa com

fungicida conteve 8 diferentes isolados e, em outra placa, repetiu-se os mesmos isolados, ou seja, cada isolado/fungicida teve duas repetições, bem como duas repetições de placas sem o fungicida (controle), e os experimentos foram conduzidos duas vezes. As placas foram incubadas por 3 dias, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após a incubação, foi realizada a medição do ponto de maior crescimento micelial (largura) das tiras em placas sem o fungicida (controle) e esse valor foi utilizado como referência para encontrar o valor de inibição das placas com fungicidas, definindo-se, assim, o ponto no gradiente de concentração em que o crescimento micelial foi reduzido em 50% (FIGURA 1 D). A distância radial entre esse ponto de 50% e o centro da placa foi mensurado, sendo essa medida um parâmetro-chave para estimar os valores efetivos da concentração de fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial (CE_{50}) (FIGURA 1 E). Os valores de CE_{50} foram determinados usando o software R, com o pacote ECX, de Torres-Londoño, Hausbeck e Hao (2016).

Com os valores de CE_{50} , também foi estimado o risco de ocorrência da sensibilidade cruzada entre os fungicidas de cada grupo químico, no qual foi correlacionado o log dos valores de CE_{50} entre os ingredientes ativos de mesmo modo de ação, sendo gerado, no final, um coeficiente de correlação R^2 , com significância a $P \leq 0,05$.

FIGURA 1 - MÉTODO DA DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Preparo dos inóculos em placas de BDA, com tiras de madeira autoclavada (A1) e o crescimento micelial do patógeno sobre essas tiras após 7 dias de incubação, a 25°C (A2), equipamento – *Spiral plater*, em inglês, com placa de corante para observar a distribuição das concentrações do produto em espiral (B), 8 tiras com crescimento micelial de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. voltados para a placa (C), placa sem fungicida (controle), com o crescimento micelial, após 3 dias de incubação e, em "a", sendo representada a distância de maior crescimento micelial (D), placa com fungicida mostrando, em "b", o ponto do gradiente espiral, onde o crescimento do fungo inibiu 50% e, em "c", a distância entre o centro da placa e o ponto de inibição de 50% (E), sendo essa a medida que foi utilizada para o cálculo da CE_{50} .

2.3 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE, EM FRUTOS DE CAQUIZEIRO (*D. kaki* L.) DESTACADOS (*EX VIVO*)

Para este experimento, foram selecionados dois isolados representativos do complexo *C. gloeosporioides* nos dois estados amostrados: LEMIDPRDk 18-06 (*C. horii*) do Paraná e LEMIDSPDk 18-6 (*C. fructicola*) de São Paulo, com fenótipos sensíveis a tebuconazole e azoxistrobina. Essas duas espécies foram selecionadas, devido às características apresentadas nos estudos do Capítulo 1 desta dissertação, como maior representatividade/importância entre as espécies agentes causais da antracnose do caquizeiro no Brasil e por serem isolados mais agressivos a partir dos testes de patogenicidades.

Foram coletados frutos imaturos (nos meses de janeiro a fevereiro) e maduros (nos meses de abril a maio) da 'Fuyu', safra 2018/19, provenientes de uma área de produção orgânica, sem aplicação de fungicidas. A 'Fuyu' foi escolhida devido à sua importância econômica (frutos grandes, doces, sem sementes e sem tanino) no mercado e por ser amplamente cultivada nas regiões produtoras de caquizeiro (AGUIAR et al., 2014).

O experimento foi conduzido em dois momentos críticos de maior suscetibilidade de ocorrência da doença no campo: um aos 42 dias após a floração (período de frutos imaturos) e o outro no período que compreende a pré-colheita dos frutos. Foram coletados 300 frutos imaturos e 300 frutos maduros, sendo distribuídos 150 frutos por espécie de *Colletotrichum* em cada experimento e cada tratamento (fungicidas + controle) com 25 repetições. Os experimentos foram repetidos duas vezes. Apenas no segundo experimento dos frutos maduros, os tratamentos tiveram 12 frutos por repetições, totalizando 72 frutos para cada espécie de *Colletotrichum*, devido à disponibilidade dos frutos no campo.

Os frutos foram previamente desinfestados por um minuto, em imersão de 70% de etanol; em seguida, mais um minuto, em imersão na solução de 0,5% de hipoclorito de sódio. Os frutos foram enxaguados três vezes, em água destilada autoclavada. O experimento foi conduzido em frutos com ferimento de três milímetros de profundidade, realizados com agulha histológica esterilizada. Posteriormente, os frutos foram tratados com os fungicidas, pelo método de imersão, por aproximadamente 10 segundos. As caldas de fungicidas foram preparadas de acordo com o recomendado

pelos fabricantes, nas bulas dos produtos, sendo diluídos em 5L de água destilada para esse ensaio (TABELA 2).

Na Tabela 2, também estão representados os fungicidas que estão registrados para a cultura do caqui no Brasil, e que foram avaliados neste estudo, seguidos dos seus respectivos nomes comerciais, ingredientes ativos, código FRAC de resistência e recomendação dos alvos biológicos (AGROFIT, 2020).

TABELA 2 - FUNGICIDAS UTILIZADOS NO ENSAIO DE SENSIBILIDADE PRÁTICA, EM FRUTOS IMATUROS E MADUROS DESTACADOS, SENDO DESCRITOS NOMES COMERCIAIS, INGREDIENTES ATIVOS, NOME DO GRUPO QUÍMICO (COM O CÓDIGO DE RESISTÊNCIA FRAC#), NOMES COMUNS E CIENTÍFICOS DAS DOENÇAS E PATÓGENOS E O PREPARO DA DILUIÇÃO DA CALDA FUNGICIDA (5L) PARA O ENSAIO

NOME COMERCIAL	INGREDIENTE ATIVO (i.a.)	NOME DO GRUPO (FRAC#)	DOENÇAS		PREPARO DA CALDA DOS FUNGICIDAS PARA IMERSÃO NOS FRUTOS	
			Nome comum	Nome do patógeno	Bula (800L/ha)	Diluição para 5L
Amistar® Top (Bayer CropScience)	Azoxistrobina Difenoconazol	Qol (#11) DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Cercospora kaki</i>	400 mL de i.a.	2,5 mL de i.a.
Mythos® (Syngenta)	Pirimetanil	AP (#9)	Mofo cinzento	<i>Botrytis cinerea</i>	2L de i.a.	12,5 mL de i.a.
Nativo® (Bayer CropScience)	Trifloxistrobina Tebuconazol	Qol (#11) DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Cercospora kaki</i>	400 mL de i.a.	2,5 mL de i.a.
Recop® (Albaugh Ltda.)	Oxicloreto de cobre	Inorgânico (#M1)	Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.	1,6 kg de i.a.	0,01 kg de i.a.
Score® (Syngenta)	Difenoconazol	DMI (#3)	Cercosporiose	<i>Cercospora kaki</i>	200 mL de i.a.	1,25 mL de i.a.

FONTE: O autor (2020).

Após o tratamento dos frutos com os fungicidas, os mesmos foram deixados para secagem, em temperatura ambiente, por três horas e, em seguida, foram transferidos para potes plásticos, com água esterilizada no fundo, para manutenção da umidade. Os frutos foram suspensos longitudinalmente, em copos de 50 mL, esterilizados, que serviram como apoio. Após 24 horas do tratamento com os fungicidas, foram preparadas as suspensões de esporos dos isolados, que foram crescidos em meio de cultura BDA, à incubação de 25°C, com fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. Para cada isolado, obteve-se a suspensão de esporo de 1×10^4 conídios mL⁻¹ e, dessa suspensão, foram inoculados 40 µL nos pontos de ferimentos dos frutos (previamente realizados e tratados com os fungicidas). Para o controle, os frutos foram inoculados com água destilada autoclavada.

As avaliações dos experimentos foram realizadas diariamente, por um período de 14 dias, para os frutos imaturos e de 10 dias para os frutos maduros. Foram estimados o período de incubação (PI), o período de latência (PL) e o diâmetro da lesão (\varnothing mm) de cada isolado/tratamento.

2.3.1 Análises estatísticas

Para estimar os períodos de incubação e latência (PI e PL) entre os tratamentos com os fungicidas, utilizou-se o método de análise de sobrevivência, usando o pacote '*survival*' (THERNEAU, 2020), pois é indicada pelo tipo de resposta de natureza "tempo até o desfecho". A variável resposta é qualitativa dicotômica, podendo ser 1 (frutos com sintomas/sinais) ou zero (frutos sem sintomas/sinais). A variável explicativa é o tempo para ocorrência de um evento (sintoma/sinais) e os tratamentos são considerados covariáveis. Para acomodar a estrutura de planejamento fatorial completo (2 isolados/spp x 6 tratamentos), foi utilizada uma abordagem paramétrica. E, por apresentar boa flexibilidade, foi adotada a distribuição de Weibull para o tempo até o desfecho, com o ajuste da modelagem feito pela função '*survreg*', sendo, assim, acomodado à censura e à estrutura experimental. No final, foi realizado teste de hipótese de igualdade com os valores de PI, para comparação dos tratamentos com fungicidas e controle (sem fungicida) nos isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados, por meio da estimativa do parâmetro de locação da análise de Weibull, pela qual foram considerados os intervalos de confiança de 95% e o teste de significância $\alpha = 0,05$.

Os diâmetros médios das lesões foram mensurados por meio de duas medidas perpendiculares (mm1 e mm2). Essas medidas foram analisadas por meio da análise de variância (ANOVA). Após a inspeção visual dos pressupostos do modelo, foi observada a necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada, devido à interpretação gráfica sugerida de λ log-likelihood, conforme descrito por Box e Cox (1964). As médias das lesões foram comparadas por meio do teste de *least significant difference* (LSD), com nível de significância (α) de 5%. Todas as análises foram realizadas com o suporte do software R (version 3.6.1).

5 RESULTADOS

5.1 ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

A Tabela 3 contém as classificações dos fenótipos obtidos do ensaio de dose discriminatória para azoxistrobina (AZO) e tebuconazol (TEB), dos 57 isolados coletados na safra 2017/18 de ramos e flores, nas regiões de São Paulo e Paraná.

A maioria dos isolados dessa população foram fenotipicamente sensíveis (S) nessa análise prévia, porém alguns isolados revelaram um indício de sensibilidade reduzida (SR). Ao todo, quatro diferentes fenótipos foram obtidos (AZO_STEB_S; AZO_STEB_{SR}; AZO_{SR}TEB_S; AZO_{SR}TEB_{SR}), com a predominância do fenótipo AZO_STEB_S (83,93%). Dentre a amostra selecionada, 11 isolados revelaram fenótipo AZO_STEB_S; um isolado, AZO_STEB_{SR}; um isolado, AZO_{SR}TEB_S e três isolados, AZO_{SR}TEB_{SR}.

TABELA 3 - PADRÃO DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. AOS INGREDIENTES ATIVOS AZOXISTROBINA E TEBUCONAZOL, E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS

continua

Isolados LEMIDDk	Colletotrichum spp. ¹	AZOXISTROBINA ²		TEBUCONAZOL ²		Fenótipos ³
		ICM (%) ²	Padrão de Sensibilidade ²	ICM (%) ²	Padrão de Sensibilidade ²	
Isolados selecionados						
PR 18-01	<i>C. nymphaeae</i>	53,48	S	13,46	SR	AZO _S TEB _{SR}
PR 18-02	<i>C. nymphaeae</i>	57,61	S	38,27	S	AZO _S TEB _S
PR 18-04	<i>C. nymphaeae</i>	25,89	SR	18,93	SR	AZO _{SR} TEB _{SR}
PR 18-07	<i>C. nymphaeae</i>	22,68	SR	35,93	S	AZO _{SR} TEB _S
PR 18-11	<i>C. melonis</i>	69,75	S	61,21	S	AZO _S TEB _S
PR 18-05	<i>C. horii</i>	58,15	S	98,37	S	AZO _S TEB _S
PR 18-06	<i>C. horii</i>	98,33	S	43,33	S	AZO _S TEB _S
PR 18-08	<i>C. horii</i>	45,54	S	97,32	S	AZO _S TEB _S
PR 18-09	<i>C. horii</i>	67,55	S	33,51	S	AZO _S TEB _S
PR 18-10	<i>C. horii</i>	76,71	S	98,45	S	AZO _S TEB _S
SP 18-01	<i>C. horii</i>	64,01	S	97,23	S	AZO _S TEB _S
SP 18-02	<i>C. fructicola</i>	10,5	SR	0	SR	AZO _{SR} TEB _{SR}
SP 18-03	<i>C. fructicola</i>	0	SR	29,57	SR	AZO _{SR} TEB _{SR}
SP 18-04	<i>C. fructicola</i>	39,94	S	36,78	S	AZO _S TEB _S
SP 18-05	<i>C. fructicola</i>	48,8	S	54,19	S	AZO _S TEB _S
SP 18-06	<i>C. fructicola</i>	46,25	S	53,42	S	AZO _S TEB _S
Outros isolados testados						
PR 18-03	<i>C. horii</i>	56,63	S	98,39	S	AZO _S TEB _S
PR 18-52	<i>C. fructicola</i>	66,87	S	11,27	SR	AZO _S TEB _S
1	cCg	55	S	68,5	S	AZO _S TEB _S
3	cCg	46	S	42,29	S	AZO _S TEB _S
4	cCg	42,17	S	37,05	S	AZO _S TEB _S
5	cCg	52,65	S	35,59	S	AZO _S TEB _S
7	cCg	51,09	S	58,41	S	AZO _S TEB _S
8	cCg	52,67	S	39	S	AZO _S TEB _S
9	cCg	34,46	S	36,2	S	AZO _S TEB _S
10	cCg	78,26	S	34,45	S	AZO _S TEB _S
11	cCg	48,34	S	32	S	AZO _S TEB _S
12	cCg	ND	ND	23,33	SR	TEB _{SR}
13	cCg	77,65	S	42,15	SR	AZO _S TEB _S
14	cCg	97,09	S	36,36	S	AZO _S TEB _S

TABELA 3 - PADRÃO DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. AOS INGREDIENTES ATIVOS AZOXISTROBINA E TEBUCONAZOL, E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS

						conclusão
ISOLADOS LEMIDDk	Colletotrichum spp. ¹	AZOXISTROBINA ²		TEBUCONAZOL ²		FENÓTIPOS ³
		ICM (%) ²	Padrão de Sensibilidade ²	ICM (%) ²	Padrão de Sensibilidade ²	
16	cCg	57,06	S	ND	ND	AZO _s
19	cCg	71,83	S	97,22	S	AZO _s TEB _s
21	cCg	95,06	S	31,6	SR	AZO _s TEB _s
23	cCg	56,58	S	47,7	S	AZO _s TEB _s
24	cCg	72,68	S	98,54	S	AZO _s TEB _s
30	cCg	98,97	S	32,56	SR	AZO _s TEB _s
34	cCg	92,12	S	48,91	S	AZO _s TEB _s
35	cCa	42,25	S	40,11	S	AZO _s TEB _s
36	cCg	57,93	S	95,12	S	AZO _s TEB _s
38	cCg	56,98	S	97,77	S	AZO _s TEB _s
41	cCg	72,08	S	35,95	S	AZO _s TEB _s
43	cCg	50,27	S	23,39	SR	AZO _s TEB _{SR}
44	cCg	61,64	S	86,64	S	AZO _s TEB _s
46	cCg	42,52	S	36,36	S	AZO _s TEB _s
47	cCg	68,71	S	99,64	S	AZO _s TEB _s
48	cCg	100	S	30,53	S	AZO _s TEB _s
49	cCg	50,45	S	40,2	S	AZO _s TEB _s
50	cCg	39,47	S	17,54	SR	AZO _s TEB _{SR}
51	cCg	51,81	S	89,76	S	AZO _s TEB _s
55	cCa	10,75	SR	23,66	SR	AZO _{SR} TEB _{SR}
56	cCg	64,45	S	94,14	S	AZO _s TEB _s
57	cCg	85,48	S	62,3	SR	AZO _s TEB _s
58	cCg	77,64	S	32,28	S	AZO _s TEB _s
60	cCg	99,46	S	44,57	S	AZO _s TEB _s
17	cCa	53,22	S	66,95	S	AZO _s TEB _s
32	cCg	67,96	S	97,18	S	AZO _s TEB _s
39	cCg	50	S	33,53	S	AZO _s TEB _s

FONTE: O autor (2020).

¹ Isolados identificados no nível de espécie e por complexo de *Colletotrichum*, sendo cCg – complexo *C. gloesporioides* e cCa – complexo *C. acutatum*.

² Percentagem de inibição do crescimento micelial em meio de cultura BDA, na dose discriminatória de 1 e 0,3 µg/mL para azoxistrobina e tebuconazol, respectivamente; ND = não determinado; S = sensível; SR = sensibilidade reduzida; AZO = azoxistrobina; TEB = tebuconazol.

5.2 SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum* spp. AOS FUNGICIDAS (IN VITRO)

Para os ingredientes ativos do grupo químico dos IQe, os valores de CE₅₀ variaram de 0,007 a 4,87 para azoxistrobina e de 0,004 a >10 para trifloxistrobina. Pelo teste de médias LSD de Fisher, os isolados pertencentes à espécie *C. fructicola*, provenientes do estado de São Paulo, revelaram uma redução da sensibilidade significativamente ($P \leq 0,05$) maior que as demais espécies, com CE₅₀ variando de 0,49 a 4,87 e 0,04 a >10, com valores médios de 1,79 e 0,31 para azoxistrobina e trifloxistrobina, respectivamente (TABELA 4).

A variação da sensibilidade entre os isolados de *Colletotrichum* spp. para os ingredientes ativos do grupo químico dos IQe pode ser melhor observada por meio da Figura 2, onde está representada a frequência (%) dos isolados em diferentes

intervalos de CE_{50} . Diante da plotagem das curvas polinomiais, nota-se o comportamento disruptivo, levando à divisão dos isolados em três diferentes grupos de sensibilidade: i) isolados com valores de CE_{50} entre 0 a 0,08; ii) isolados com CE_{50} entre 0,2 a 0,6; e iii) isolados com $CE_{50} > 1$.

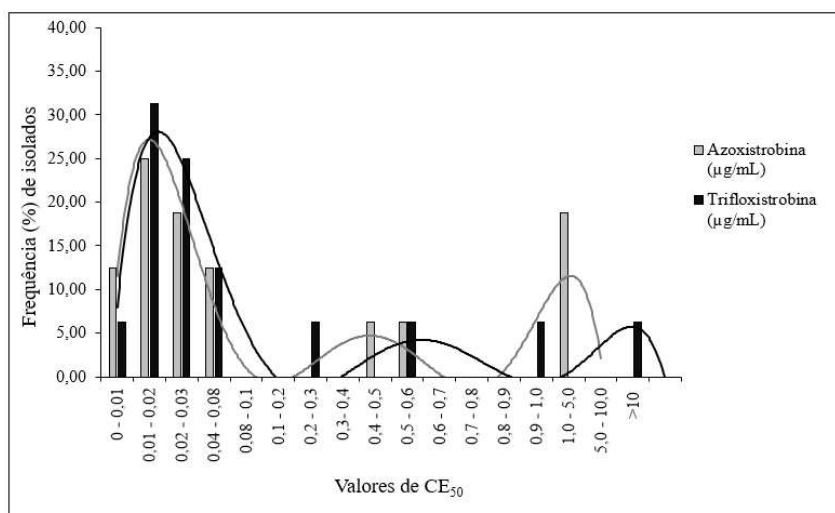
TABELA 4 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO IQe's (FRAC#11), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL

ISOLADOS LEMIDDk	ESPÉCIES	MESORREGIÃO	MÉDIA CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	
			Azoxistrobina	Trifloxistrobina
PR18-01	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,02	0,02
PR18-02	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,05	0,01
PR18-04	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,02	0,01
PR18-07	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,02	0,01
PR18-11	<i>C. melonis</i>	RMC	0,04	0,04
PR18-05	<i>C. horii</i>	RMC	0,017	0,02
SP18-01	<i>C. horii</i>	RMC	0,017	0,02
PR18-06	<i>C. horii</i>	RMC	0,01	0,02
PR18-08	<i>C. horii</i>	RMC	0,007	0,01
PR18-10	<i>C. horii</i>	RMC	0,008	0,004
PR18-09	<i>C. horii</i>	RI	0,01	0,01
SP18-02	<i>C. fructicola</i>	RI	4,87	>10
SP18-03	<i>C. fructicola</i>	RI	1,3	0,04
SP18-04	<i>C. fructicola</i>	RI	0,59	0,23
SP18-05	<i>C. fructicola</i>	RI	0,49	0,57
SP18-06	<i>C. fructicola</i>	RI	3,61	0,92
Média CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por espécie de <i>Colletotrichum</i>		<i>C. fructicola</i>	1,79 a	0,31 a
		<i>C. melonis</i>	0,04 b	0,04 b
		<i>C. nymphaeae</i>	0,019 b	0,01 c
		<i>C. horii</i>	0,012 b	0,02 bc

FONTE: O autor (2020).

- ¹ Valores médios de CE_{50} por espécie, analisados pelo teste de comparação de médias LSD, com significância de $P \leq 0,05$.

FIGURA 2 DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) PARA AZOXISTROBINA (EM CINZA) E TRIFLOXISTROBINA (EM PRETO), ENTRE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., CAUSADORES DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL



FONTE: O autor (2020).

Os valores de CE_{50} entre os isolados variaram de 0,003 a 0,51 e 0,01 a 0,43 para os ingredientes ativos difenoconazol e tebuconazol, respectivamente. Em relação às médias dos valores de CE_{50} por espécie, nota-se que não há diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os isolados de *C. fructicola* e *C. nymphaeae* para ambos os ingredientes ativos testados, porém, quando realizada a análise com os demais isolados/espécies, há diferença significativa. A espécie *C. horii* apresentou a menor sensibilidade, com valores médios de CE_{50} entre 0,02 e 0,01 para difenoconazol e tebuconazol, respectivamente (TABELA 5).

Quanto à distribuição dos valores de CE_{50} entre os isolados, nota-se um comportamento mais gradual das curvas aos ingredientes ativos do grupo químico dos IDM. Para ambos os ingredientes ativos testados, o comportamento da sensibilidade foi semelhante, iniciando as curvas com picos em valores CE_{50} , considerados sensíveis (abaixo de 0,04), seguindo para o segundo pico, no qual foram agrupados os valores entre 0,1 – 0,2 para difenoconazol e 0,3 – 0,5 para tebuconazol, indicando tendência à redução da sensibilidade a esses ingredientes ativos (FIGURA 3).

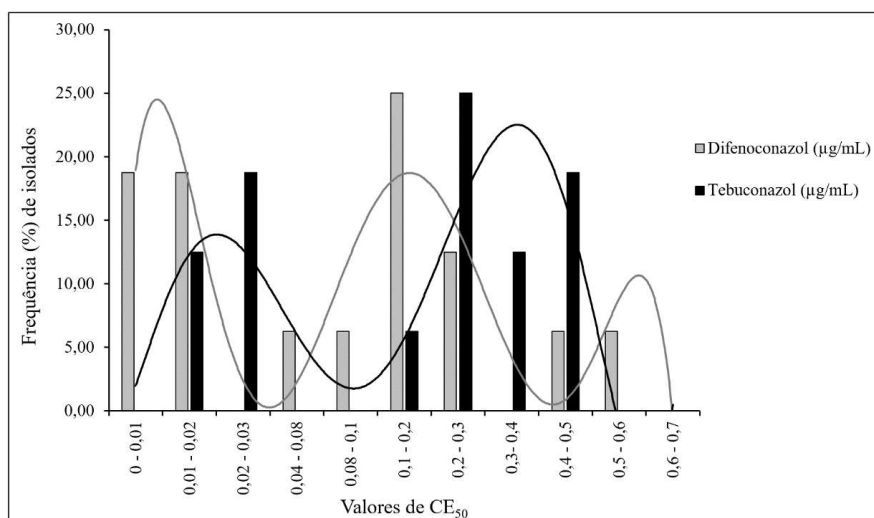
TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO IDM's (FRAC#3), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL

ISOLADOS LEMIDDk	ESPÉCIES	MESORREGIÃO	MÉDIA CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	
			Difenoconazol	Tebuconazol
PR18-01	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,25	0,43
PR18-02	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,15	0,27
PR18-04	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,24	0,4
PR18-07	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,12	0,26
PR18-11	<i>C. melonis</i>	RMC	0,13	0,15
PR18-05	<i>C. horii</i>	RMC	0,003	0,01
SP18-01	<i>C. horii</i>	RMC	0,003	0,01
PR18-06	<i>C. horii</i>	RMC	0,01	0,03
PR18-08	<i>C. horii</i>	RMC	0,01	0,02
PR18-10	<i>C. horii</i>	RMC	0,01	0,02
PR18-09	<i>C. horii</i>	RI	0,001	0,02
SP18-02	<i>C. fructicola</i>	RI	0,16	0,43
SP18-03	<i>C. fructicola</i>	RI	0,47	0,34
SP18-04	<i>C. fructicola</i>	RI	0,07	0,26
SP18-05	<i>C. fructicola</i>	RI	0,09	0,25
SP18-06	<i>C. fructicola</i>	RI	0,51	0,39
Média CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por espécie de <i>Colletotrichum</i>		<i>C. fructicola</i>	0,22 a	0,32 a
		<i>C. melonis</i>	0,13 b	0,15 b
		<i>C. nymphaeae</i>	0,18 ab	0,33 a
		<i>C. horii</i>	0,02 c	0,01 c

FONTE: O autor (2020).

¹ Valores médios de CE_{50} por espécie, analisados pelo teste de comparação de médias LSD, com significância de $P \leq 0,05$.

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) PARA DIFENOCONAZOL (EM CINZA) E TEBUCONAZOL (EM PRETO), ENTRE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., CAUSADORES DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL



FONTE: O autor (2020).

Para o grupo químico dos ISDH, os valores de CE_{50} variaram mais para o ingrediente ativo pentiopirade, de 0,02 a 0,48, enquanto, para o i.a. benzovindiflupir, o maior valor de CE_{50} encontrado foi de 0,02. A variação entre os isolados foi de $<0,001$ a 0,02, indicando padrão de sensibilidade extremamente sensível a esse fungicida. Entre as espécies de *Colletotrichum*, não houve diferença significativa na média dos isolados para o fungicida benzovindiflupir, porém, para o pentiopirade, o isolado de *C. melonis* apresentou o maior valor (0,36) de CE_{50} , seguido dos isolados de *C. horii* (0,26), *C. fruticola* (0,12) e *C. nymphaeae* (0,02), diferindo, significativamente ($P \leq 0,05$), por meio do teste de médias de LSD de Fisher (TABELA 6).

Observa-se, na Figura 4, pico inicial bem definido para o fungicida benzovindiflupir, agrupando os valores de CE_{50} nos intervalos de 0 – 0,03. Já para o ingrediente ativo pentiopirade, nota-se curva com o pico mais aberto, indicando relativa variação dos valores de CE_{50} entre os isolados, agrupando valores desde 0 até 0,4.

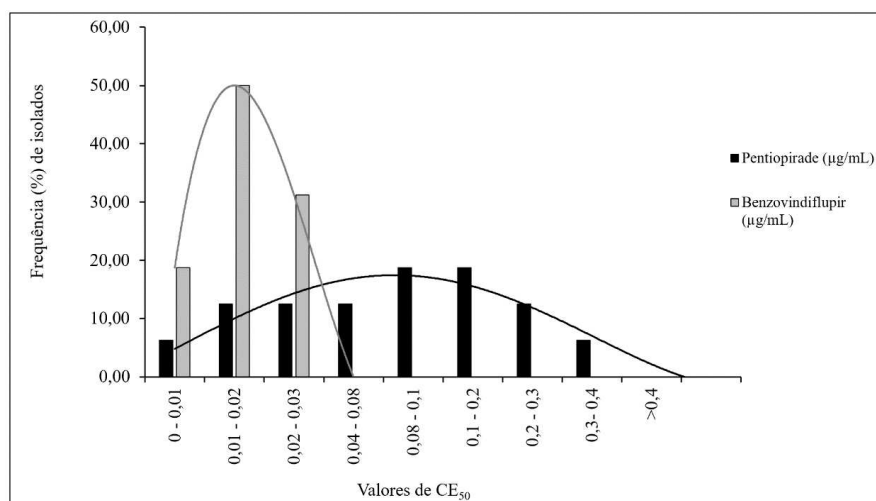
TABELA 6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO ISDH's (FRAC#7), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL

ISOLADOS LEMIDDk	ESPÉCIES	MESORREGIÃO	MÉDIA CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	
			Pentiopirade	Benzovindiflupir
PR18-01	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,04	0,02
PR18-02	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,03	0,01
PR18-04	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,03	0,01
PR18-07	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	0,01	0,008
PR18-11	<i>C. melonis</i>	RMC	0,36	0,02
PR18-05	<i>C. horii</i>	RMC	0,17	0,01
SP18-01	<i>C. horii</i>	RMC	0,17	0,01
PR18-06	<i>C. horii</i>	RMC	0,48	0,02
PR18-08	<i>C. horii</i>	RMC	0,37	<0,001
PR18-10	<i>C. horii</i>	RMC	0,23	<0,001
PR18-09	<i>C. horii</i>	RI	0,07	0,01
SP18-02	<i>C. fructicola</i>	RI	0,25	0,02
SP18-03	<i>C. fructicola</i>	RI	0,2	0,01
SP18-04	<i>C. fructicola</i>	RI	0,02	0,02
SP18-05	<i>C. fructicola</i>	RI	0,02	0,01
SP18-06	<i>C. fructicola</i>	RI	0,14	0,01
Média CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por espécie de <i>Colletotrichum</i>		<i>C. fructicola</i>	0,12 c	0,01 a
		<i>C. melonis</i>	0,36 a	0,02 a
		<i>C. nymphaeae</i>	0,02 d	0,01 a
		<i>C. horii</i>	0,26 b	0,01 a

FONTE: O autor (2020).

- ¹ Valores médios de CE_{50} por espécie, analisados pelo teste de comparação de médias LSD, com significância de $P \leq 0,05$.

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) PARA BENZOVINDIFLUPIR (EM CINZA) E PENTIOPIRADE (EM PRETO), ENTRE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., CAUSADORES DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL



FONTE: O autor (2020).

Os valores de CE_{50} para os fungicidas do grupo químico dos AP foram significativamente ($P \leq 0,05$) diferentes, com os valores médios da sensibilidade maiores para o isolado de *C. melonis* (171,9) e menores para os isolados de *C. horii* (58,82), ao fungicida ciprodinil, enquanto, para o fungicida pirimetanil, os maiores valores médios de sensibilidade foram estimados para os isolados de *C. fructicola* (538,70) em comparação com os demais isolados (TABELA 7).

TABELA 7 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. AOS FUNGICIDAS DO GRUPO QUÍMICO AP's (FRAC#9), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL

ISOLADOS LEMIDDk	ESPÉCIES	MESORREGIÃO	MÉDIA CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	
			Ciprodinil	Pirimetanil
PR18-01	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	104,44	267,95
PR18-02	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	136,71	309,17
PR18-04	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	106,09	296,63
PR18-07	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	111,6	188,71
PR18-11	<i>C. melonis</i>	RMC	171,9	213,78
PR18-05	<i>C. horii</i>	RMC	45,17	185,22
SP18-01	<i>C. horii</i>	RMC	24,09	618,68
PR18-06	<i>C. horii</i>	RMC	74,84	613,87
PR18-08	<i>C. horii</i>	RMC	74,32	259,37
PR18-10	<i>C. horii</i>	RMC	99,65	554,46
PR18-09	<i>C. horii</i>	RI	ND	48,38
SP18-02	<i>C. fructicola</i>	RI	126,2	965,55
SP18-03	<i>C. fructicola</i>	RI	117,12	>1000
SP18-04	<i>C. fructicola</i>	RI	123,55	467,06
SP18-05	<i>C. fructicola</i>	RI	116,92	241,62
SP18-06	<i>C. fructicola</i>	RI	112,02	827,53
Média CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por espécie de <i>Colletotrichum</i>		<i>C. fructicola</i>	118,59 b	538,70 a
		<i>C. melonis</i>	171,9 a	213,74 b
		<i>C. nymphaeae</i>	113,84 b	263,09 b
		<i>C. horii</i>	58,82 c	321,48 b

FONTE: O autor (2020).

¹ Valores médios de CE_{50} por espécie, analisados pelo teste de comparação de médias LSD, com significância de $P \leq 0,05$.

Em relação aos fungicidas de modo de ação multisítio, tanto para o fungicida captan, quanto para o fungicida clorotalonil, não houve diferença significativa nos valores médios de CE_{50} entre as espécies de *Colletotrichum*, exceto os isolados de *C. horii*, os quais apresentaram menores valores de sensibilidade em ambos ingredientes ativos testados (TABELA 8).

TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE_{50}) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. AOS FUNGICIDAS CAPTAN (FRAC#M04) E CLOROTALONIL (FRAC#M05), PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL

ISOLADOS LEMIDDk	ESPÉCIES	MESORREGIÃO	MÉDIA CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	
			Captan	Clorotalonil
PR18-01	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	70,12	23,5
PR18-02	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	47,25	20,31
PR18-04	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	34,58	13,32
PR18-07	<i>C. nymphaeae</i>	RMC	34,25	2,84
PR18-11	<i>C. melonis</i>	RMC	48,17	12,4
PR18-05	<i>C. horii</i>	RMC	31,74	2,84
SP18-01	<i>C. horii</i>	RMC	22,35	2,66
PR18-06	<i>C. horii</i>	RMC	40,09	3,75
PR18-08	<i>C. horii</i>	RMC	29,09	2,2
PR18-10	<i>C. horii</i>	RMC	20,56	1,16
PR18-09	<i>C. horii</i>	RI	34,87	ND
SP18-02	<i>C. fructicola</i>	RI	61,65	16,68
SP18-03	<i>C. fructicola</i>	RI	40,88	15,65
SP18-04	<i>C. fructicola</i>	RI	39,75	6,42
SP18-05	<i>C. fructicola</i>	RI	45,52	4,15
SP18-06	<i>C. fructicola</i>	RI	35,16	3,38
Média CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por espécie de <i>Colletotrichum</i>		<i>C. fructicola</i>	43,95 a	8,00 a
		<i>C. melonis</i>	47,75 a	11,22 a
		<i>C. nymphaeae</i>	45,16 a	13,10 a
		<i>C. horii</i>	30,25 b	2,62 b

FONTE: O autor (2020).

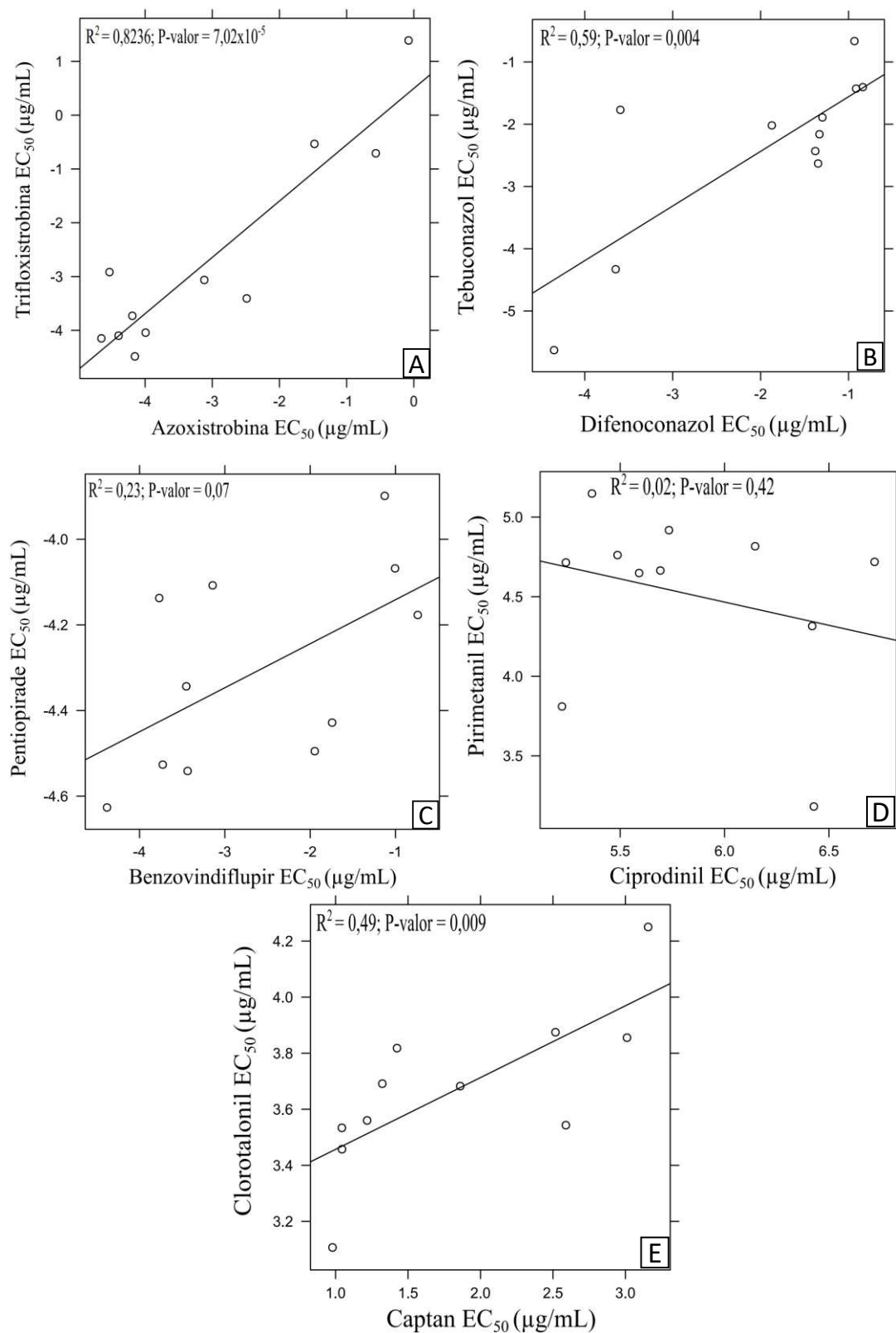
¹ Valores médios de CE_{50} por espécie, analisados pelo teste de comparação de médias LSD, com significância de $P \leq 0,05$.

5.2.1 Sensibilidade cruzada

Na Figura 5, estão representados os riscos de ocorrência de sensibilidade cruzada entre os ingredientes ativos com mesmo modo de ação. Dentre os ingredientes ativos analisados, apenas os do grupo químico dos ISDH revelaram uma correlação positiva, baixa e não significativa ($R^2 = 0,23$; $P = 0,07$) (FIGURA 5 C). Já os ingredientes ativos do grupo químico dos AP's revelaram valores de correlação negativa ($R^2 = -0,02$; $P = 0,42$) entre os isolados, possivelmente, devido aos valores de EC_{50} serem estimados mais altos para o pirimetanil do que para o ciprodinil (FIGURA 5 D).

Os ingredientes ativos do grupo químico dos IDM revelaram uma correlação positiva e significativa ($R^2 = 0,59$; $P = 0,004$), com risco moderado de ocorrência de uma sensibilidade cruzada, assim como observado para os fungicidas com o modo de ação multisítio ($R^2 = 0,49$; $P = 0,009$) (FIGURAS 5 B e 6 E). No entanto, os ingredientes ativos do grupo dos IQe revelaram alto risco de ocorrência de uma sensibilidade cruzada ($R^2 = 0,82$; $P = 7,02 \times 10^{-5}$) entre os isolados testados (FIGURA 5 A).

FIGURA 5 - ANÁLISE DA SENSIBILIDADE CRUZADA ENTRE OS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp., COLETADOS DE CAQUIZEIRO, NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Nas figuras, estão correlacionados os valores do log da CE_{50} dos fungicidas para os grupos químicos dos IQe's (A), IDM's (B), ISDH (C), AP's (D), Ftalimida e Cloronitrila (E), com significância de $P = 0,05$.

5.3 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE, EM FRUTOS DE CAQUIZEIRO (*D. kaki* L.) DESTACADOS (*EX VIVO*)

Em ambos os ensaios, frutos imaturos e frutos maduros, tanto o isolado de *C. horii* (LEMIDPRDk 18-06) quanto o de *C. fructicola* (LEMIDSPDk 18-06) foram capazes de causar doença (TABELA 9). No entanto, houve diferentes respostas significativas entre os isolados nos ensaios. Em frutos imaturos, a incidência da doença foi menor para o isolado de *C. fructicola* do que comparado com o isolado de *C. horii*. O isolado de *C. horii* revelou ser mais agressivo que o isolado de *C. fructicola* nessa fase fenológica da planta, com maiores diâmetros médios. Por exemplo, para os frutos utilizados como tratamento controle, o diâmetro médio de lesão foi de 15,28 mm, contra 1,56 mm de *C. fructicola*. Dentre os produtos avaliados, os fungicidas à base de pirimetanil e oxicloreto de cobre foram menos eficientes que os demais, revelando maior incidência da doença e diâmetros médios da lesão nos frutos. Além disso, o risco de sobrevida (PI) foi significativamente menor que nos demais tratamentos (TABELA 9).

No ensaio de frutos maduros, a incidência da doença foi igual para ambos os isolados em frutos controle e os valores dos diâmetros médios das lesões foram semelhantes, sendo 12,39 mm para o isolado de *C. fructicola* e 10,17 mm para o isolado de *C. horii*. No entanto, quando analisados as incidências e os diâmetros médios das lesões entre os tratamentos, o isolado de *C. fructicola* foi mais agressivo que o isolado de *C. horii*. Para o isolado de *C. fructicola*, todos os tratamentos apresentaram incidência da doença acima de 50%, exceto os frutos que receberam o tratamento fungicida à base de azoxistrobina + difenoconazol. Entre os tratamentos fungicidas testados, os frutos tratados com pirimetanil revelaram resultados menos eficientes no controle da doença, com lesões maiores (7,12 mm) que os demais e risco de sobrevida igual aos frutos controle. Para o isolado de *C. horii*, os fungicidas à base de pirimetanil e oxicloreto de cobre revelaram ser menos eficientes no controle da antracnose, com incidências de 64 e 56% e diâmetros médios das lesões de 4,08 e 2,65 mm, respectivamente, e risco de sobrevida igual ao controle (TABELA 9).

TABELA 9 - TESTE DE EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS (*ex vivo*) EM FRUTOS IMATUROS E MADUROS DE CAQUIZEIRO 'FUYU' COM FERIMENTO, COM INOCULAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp., AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE. FORAM ESTIMADOS PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI), PERÍODO DE LATÊNCIA (PL) E DIÂMETRO DA LESÃO (mm)

TRATAMENTO	n	ISOLADO DE <i>Colletotrichum horii</i>				ISOLADO DE <i>Colletotrichum fructicola</i>			
		Incidência (%)	PI (dias) ¹	PL (dias) ¹	Diâmetro da lesão (mm) ± std ²	Incidência (%)	PI (dias) ¹	PL (dias) ¹	Diâmetro da lesão (mm) ± std ²
Frutos imaturos									
Controle	25	96	5,5 a	9,5	15,28 ± 1,27 a	72	7 a	-	1,56 ± 0,65 a
Pirimetanil	25	84	8 ab	12,8	7,45 ± 3,27 b	16	16 bc	-	0,17 ± 1,12 bc
Oxicloreto de cobre	25	88	7 b	13,3	8,01 ± 2,13 b	52	9 a	-	0,65 ± 0,62 b
Difenoconazol	25	44	15,9 c	-	0,2 ± 1,56 c	12	44 c	-	0,03 ± 0,27 c
Trifloxistrobina + Tebuconazol	25	48	14,5 c	-	0,51 ± 2,16 c	16	23,5 bc	-	0,06 ± 0,33 c
Azoxistrobina + Difenoconazol	25	44	16 c	-	0,1 ± 0,86 c	8	36 c	-	0,01 ± 0,15 c
Frutos maduros									
Controle	25	88	3,7 a	6,6	10,17 ± 1,56 a	88	3,7 a	7,2	12,39 ± 1,87 a
Pirimetanil	25	64	6 a	9	4,08 ± 2,52 b	88	3,7 a	11	7,12 ± 1,10 b
Oxicloreto de cobre	25	56	8 ab	12	2,65 ± 2,52 b	64	7,9 bc	12	3,42 ± 2,37 c
Difenoconazol	25	16	31,5 c	-	0,12 ± 0,67 c	64	7,4 bc	12,9	3,13 ± 2,04 c
Trifloxistrobina + Tebuconazol	25	20	18,5 bc	-	0,17 ± 0,72 c	52	7,3 bc	22	1,41 ± 1,53 c
Azoxistrobina + Difenoconazol	25	24	16 bc	-	0,4 ± 0,94 c	48	10,4 c	-	1,34 ± 1,27 c

FONTE: O autor (2020).

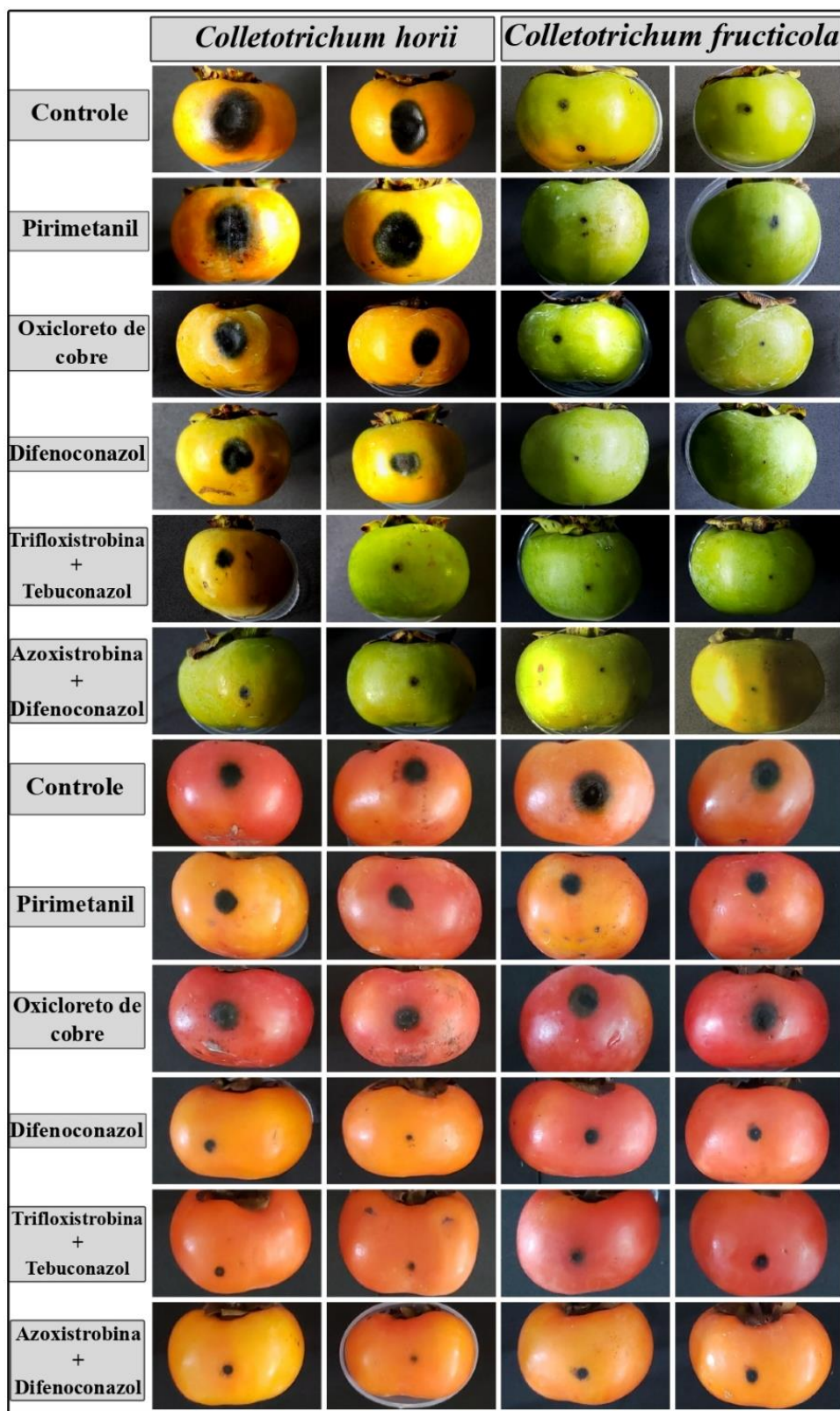
¹ Os valores de PI e PL foram estimados por meio do modelo de distribuição paramétrica de Weibull. Com os valores de PI, foram estimados os parâmetros de locação para comparação dos tratamentos em cada espécie. Valores com mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, significância $\alpha = 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

² Os valores médios do diâmetro da lesão seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de LSD Fisher ($P \leq 0,05$).

No geral, para ambas espécies, os fungicidas à base dos ingredientes ativos difenoconazol, trifloxistrobina + tebuconazol e azoxistrobina + difenoconazol foram mais eficientes para o controle de antracnose, com riscos de sobrevida longos, diferindo significativamente do controle, e, na maioria dos casos, entre os demais tratamentos fungicidas, além de apresentarem menor incidência da doença e diâmetros médios das lesões.

Na Figura 6, estão expostos os sintomas da antracnose nos frutos imaturos e maduros de caquizeiro 'Fuyu'. Mediante a figura ilustrativa, é possível visualizar melhor os valores expressos dos diâmetros das lesões na Tabela 9, bem como as características das lesões nos frutos com e sem tratamento fungicida (controle), causadas pelo isolado de *C. horii* e *C. fructicola*.

FIGURA 6 - SINTOMAS DE ANTRACNOSE, CAUSADA POR *C. horii* E *C. fructicola*, EM FRUTOS IMATUROS (FRUTOS VERDES) E MADUROS DE CAQUIZEIRO 'FUYU', PROVENIENTES DO TESTE DE EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS



FONTE: O autor (2020).

6 DISCUSSÃO

O estudo inicial de dose discriminatória para os isolados de ramos e flores da safra 2017/18 indicou quatro fenótipos diferentes relacionados aos dois ingredientes ativos testados, sendo AZOsTEBs os mais frequentes, o que comprova que a população proveniente do inóculo primário das duas mesorregiões estudadas ainda se enquadra como população sensível. Esse método é útil para análise inicial rápida e prática (LICHTENBERG et al., 2016), pois, dependendo dos níveis de sensibilidade presentes na população de isolados, os valores podem variar, devido à resposta intrínseca de cada produto (HOLB; SCHNABEL, 2007; YUAN et al., 2013), bem como a característica genética da população. Para este trabalho, as doses utilizadas no ensaio foram satisfatórias para selecionar alguns isolados para investigação mais detalhada (CE₅₀). Os estudos sequenciais de CE₅₀, realizados com maior número de fungicidas, indicaram variação entre isolados / espécies / mesorregiões estudadas. Além disso, neste trabalho, apresenta-se, pela primeira vez, um estudo de linha de base para os ingredientes ativos que ainda não foram registrados para a cultura do caquizeiro. A eficiência de alguns fungicidas foi comprovada em testes com frutos destacados, mas se observaram diferenças no comportamento do controle da doença em frutos verdes, em relação a frutos maduros.

Para melhor conceitualização, este trabalho é discutido com base nas comparações dos valores de CE₅₀ de outros estudos, sendo utilizado o termo sensibilidade reduzida, devido não terem sido investigados os mecanismos genéticos de resistência existentes para alguns grupos químicos de sítio-específico testados. Apenas dois isolados (LEMIDSPDk 18-02 e LEMIDSPDk 18-06) foram investigados quanto ao genótipo de resistência para o grupo IQe, com a amplificação da região do *cytb* (dado não apresentado).

Os resultados de CE₅₀ indicam pequena sensibilidade reduzida aos fungicidas para algumas espécies de *Colletotrichum* spp., em especial, para os isolados de *C. fructicola*, que revelaram maiores valores de CE₅₀ para os ingredientes ativos do grupo IQe. Dois isolados: LEMIDSPDk 18-02 e LEMIDSPDk 18-06 revelaram altos valores para azoxistrobina, sendo de 4,87 e 3,61 µg/mL, respectivamente, e, para trifloxistrobina, o isolado LEMIDSPDk 18-02 apresentou valor de CE₅₀ >10 µg/mL. A sensibilidade reduzida para IQe's, geralmente, está relacionada com mutações no

gene citocromo *b* (*cytb*), atribuídas às substituições em três códons de aminoácidos. Na literatura, têm-se relatos das mudanças de glicina para alanina, no códon 143 (G143A); da fenilalanina para leucina, no códon 129 (F129L); e da glicina para arginina, no códon 137 (G137R) (GISI et al., 2002; KLOSOWSKI et al., 2015; SEMAR et al., 2007). Neste trabalho, foram investigados os mecanismos de resistência para IQe nesses dois isolados, com amplificação da região do *cytb*, e nenhuma mutação foi detectada. Fato semelhante foi observado para os isolados de *C. acutatum*, em morangueiro (BAGGIO et al., 2018), e para a *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda do pessegueiro. Isolados com sensibilidade reduzida para azoxistrobina revelaram altos valores de CE₅₀, mas não foram encontradas mutações no gene *cytb* (PEREIRA et al., 2017). Para os isolados de *C. acutatum*, agente causal da podridão dos citros (PFC), também não foram detectadas mutações e mudanças na sensibilidade à trifloxistrobina, quando comparadas diferentes populações de isolados, de diferentes safras (GAMA et al., 2020). Nesse mesmo trabalho, os autores também não detectaram diferenças da sensibilidade ao longo do tempo, para os ingredientes ativos difenoconazol e tebuconazol.

No geral, no presente trabalho, foi observada predominância de população de isolados sensíveis aos fungicidas, assim como analisado previamente, pelo ensaio de dose discriminatória. Um fato interessante observado neste trabalho ocorreu nos resultados de CE₅₀ dos isolados de *C. horii*, visto que todos revelaram serem sensíveis aos fungicidas testados. Esse resultado para a espécie *C. horii* corrobora outros trabalhos desenvolvidos no mundo, já que, até então, não se tem relatos de resistência ou sensibilidade reduzida para o caquizeiro (GANG et al., 2015; YU et al., 2019).

As diferenças entre as espécies de *Colletotrichum* quanto à sensibilidade aos fungicidas vêm sendo, recentemente, relatadas entre as espécies frutíferas (DOWLING et al., 2020), com destaque para diferenças de sensibilidade aos fungicidas dos grupos IQe's, IDM's, MetilBenzimidazol Carbamato (MBC), e sensibilidade limitada para o grupo dos Inibidores da Succinato Desidrogenase (ISDH). Essas diferenças têm sido relatadas em pessegueiro, em que vários isolados de *C. nymphaeae* foram resistentes a flutriafol e fenbuconazol, porém sensíveis a tebuconazol e difenoconazol, enquanto isolados de *C. fiorinae* foram sensíveis a todos os fungicidas testados (CHEN et al.,

2016). Na Carolina do Norte – EUA, em pomares convencionais de pessegueiro, foi relatada resistência dupla para fungicidas dos grupos IQe e MBC, para a espécie *C. siamenses*, enquanto os isolados de *C. fructicola* foram sensíveis (HU; GRABKE; SCHNABEL, 2015). Já para a podridão amarga da macieira no Japão, foi relatado o oposto: os isolados de *C. fructicola* apresentaram resistência dupla para IQe e MBC e não foi detectada resistência para os isolados de *C. siamense* (YOKOSAWA et al., 2017). No Brasil, diferenças de sensibilidades para azoxistrobina foram observadas entre os isolados coletados de diferentes partes da planta de macieira e alguns isolados foram altamente resistentes, porém não foram detectadas mutações no gene *cytb* (MOREIRA et al., 2019a).

Com os valores de CE_{50} , foram também determinados os riscos de ocorrência de sensibilidade cruzada entre os fungicidas de mesmo modo de ação. O conhecimento dos riscos de ocorrências da sensibilidade cruzada é importante para fornecer recomendações corretas dos ingredientes ativos para controle das doenças. Foi observado alto risco ($R^2 = 0,82$; $P = 7,02 \times 10^{-5}$) de ocorrer sensibilidade cruzada entre os fungicidas do grupo dos IQe's, enquanto os grupos dos IDM revelaram risco médio ($R^2 = 0,59$; $P = 0,004$) e, entre os fungicidas dos grupos dos ISDH's, foi observado baixo risco de ocorrência da sensibilidade cruzada ($R^2 = 0,23$; $P = 0,07$). Chen et al. (2016) relataram, para pessegueiro, que os isolados de *C. fructicola* apresentaram correlação positiva e significativa ($R^2 = 0,9$) para ocorrência de sensibilidade cruzada, entre os fungicidas tebuconazol e difenoconazol, enquanto os isolados de *C. nymphaeae* apresentaram risco baixo ($R^2 = 0,1$). Já entre os fungicidas do grupo dos anilino pirimidinas (AP's), houve uma correlação negativa

Diante dos resultados de sensibilidade cruzada, é necessária atenção para os fungicidas do grupo dos IQe's, para que não resultem em falhas do controle da doença no campo. Por sua vez, a baixa correlação observada para os fungicidas ISDH's indica que eles são potenciais produtos a serem indicados para o controle de *Colletotrichum* spp. em caquizeiro, principalmente, o ingrediente ativo benzovindiflupir. Todos os isolados apresentaram valores extremamente sensíveis, sendo $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ o máximo valor de CE_{50} observado. Os ingredientes ativos desse grupo químico vêm sendo relatados como alternativas eficazes para controle de *Colletotrichum* spp. em outros patossistemas, como para *C. fiorinae* em pistache (LICHTENBERG et al., 2020) e *C. gloeosporioides sensu lato*, agente causal da

podridão de coroa em morangueiro (OLIVEIRA et al., 2020). Recentemente, Dowling et al. (2020) enfatizaram que o ingrediente ativo benzovindiflupir oferece potencial eficácia intrínseca contra os patógenos.

Os fungicidas do grupo ISDH's atuam no complexo II da respiração celular e são classificados com risco médio a alto de selecionar resistência (FRAC, 2020). Há relatos de, pelo menos, oito mutações conhecidas no gene mitocondrial *sdhB* (AMIRI; HEATH; PERES, 2014; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2017; HU; FERNÁNDEZ-ORTUÑO; SCHNABEL, 2016; ZUNIGA et al., 2019). Ishii et al. (2010) reportaram resistência cruzada incompleta entre alguns fungicidas desse grupo para várias espécies fúngicas. No entanto, experimentos de acoplamento das moléculas (*docking*) sugerem que alguns fungicidas apresentam ligações das moléculas idênticas. Além disso, os padrões de resistência cruzada entre os fungicidas desse grupo são complexos, pois diferentes mutações podem ocorrer, sendo que algumas conferem resistência completa e outras não, e isso ainda vai variar de acordo com o papel de cada genótipo mutante na população de isolado (STAMMLER et al. 2015; SIEROTZKI et al. 2011; SIEROTZKI; SCALLIET, 2013; STAMMLER et al. 2015).

Os ensaios para teste de eficiência dos fungicidas são importantes para conhecimento antecipado de possíveis falhas do controle no campo (GHINI; KIMATI, 2000), podendo ser realizados tanto em plantas como em frutos tratados com a concentração recomendada para o produtor (SCHNABEL et al., 2004; LICHTENBERG et al., 2016). Apesar de este ensaio ter sido realizado com apenas dois isolados, foi possível extrair resultados interessantes para a compreensão da efetividade desses produtos, sobre os quais, até então, não se tinha nada relatado. Foi observada diferença de agressividade entre os isolados nos frutos imaturos e maduros. O isolado de *C. horii* causou maiores lesões em frutos imaturos e foi mais agressivo, com altas incidência da doença em três tratamentos (testemunha, pirimetanil e oxicloreto de cobre), enquanto o isolado de *C. fructicola* quase não causou doença em frutos imaturos de caqui, porém, para os frutos maduros, ele foi mais agressivo que o isolado de *C. horii*. No geral, tanto para frutos imaturos, quanto para frutos maduros, os tratamentos comerciais, à base de difenoconazol ou de misturas com ingredientes ativos dos grupos IQe e IDM, foram mais eficazes no controle da doença do que os demais tratamentos à base de pirimetanil e oxicloreto de cobre. Para o PFC dos

citros, também foi relatado que os produtos que contêm misturas de IQe e IDM são os mais efetivos para controle de *C. acutatum* (GAMA et al., 2020).

Este estudo trouxe novas análises para o ensaio de eficiência dos fungicidas, sendo as eficiências comprovadas por meio das distribuições dos parâmetros de Weibull, além da incidência da doença e dos diâmetros médios das lesões. Para experimentos fatoriais, cujo objetivo é analisar a correlação desses fatores ao longo de um tempo, bem como estimar o período de incubação de uma doença, assume-se o modelo de regressão paramétrico para análise desses dados. Em relação aos estudos de sobrevivência, esses modelos podem estimar a distribuição do tempo de vida de um patógeno da mesma maneira que podem determinar parâmetros importantes para análise de interações de fatores (ZHANG, 2016). Neste estudo, ofereceram maior confiabilidade para comparação dos testes de igualdade entre os tratamentos fungicidas e controle, para cada espécie de *Colletotrichum*.

Portanto, diante do PI estimado, observou-se que os três fungicidas, anteriormente citados, foram mais eficientes, devido, principalmente, ao aumento da probabilidade de sobrevida, permitindo, talvez, ampliar os intervalos de aplicação. Assim, reduzirá os custos aos produtores, bem como poderá haver menor pressão de seleção dos fungicidas aos patógenos. No entanto, deve-se atenção ao longo das safras, para a resposta de sensibilidade reduzida do isolado de *C. fructicola* em frutos maduros, sendo necessários novos monitoramentos da sensibilidade para que não ocorra perda da eficiência desses produtos e isso possa implicar falha no campo.

Dowling et al. (2020) relataram que as diferenças entre as sensibilidades das espécies de *Colletotrichum* aos fungicidas podem estar associadas a alguns fatores, como: i) serem inerentes em população de isolados de apenas uma localidade geográfica; ii) ou terem surgido como pressão de seleção, influenciada por frequência e densidade de inóculos com espécies específicas; e iii) influxo de fenótipos selvagens de hospedeiros próximos. Outro fator é devido à alta variabilidade genética existente entre as espécies de *Colletotrichum*, nas áreas de produções de frutíferas, que podem apresentar diferentes ciclos de vida (PERES et al., 2005; DE SILVA et al., 2017; DA SILVA et al., 2020), taxonomias (CANNON et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012) e biologias (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004), que acabam favorecendo o patógeno se adaptar às

adversas condições do ambiente, ou devido às interferências do próprio homem, como escolhas equivocadas de produtos e aplicações contínuas de um mesmo ingrediente ativo, gerando pressão de seleção dos patógenos aos fungicidas.

Considerando esses fatores, que podem ser determinantes para controle da doença, devido ao pequeno número de isolados avaliados neste estudo, não é possível inferir comportamentos generalizados dessas espécies de *Colletotrichum* quanto à sensibilidade aos fungicidas para o caquizeiro. Para tanto, seria necessário ampliar essa população para verificação mais precisa da frequência de cada espécie em relação aos fungicidas em diferentes localidades geográficas, bem como investigar os mecanismos genéticos de resistência para cada grupo químico, além de realizar testes de eficiências (*ex vivo* e *in vivo*) de produtos com maior número de isolados, com diferentes fenótipos e espécies causadoras da antracnose.

Por sua vez, os resultados obtidos neste estudo são importantes para serem considerados, sendo o primeiro levantamento dos níveis de sensibilidade aos fungicidas, de *Colletotrichum* spp., que está causando antracnose do caquizeiro no Brasil. Além disso, foram testados dez diferentes fungicidas, servindo como estudo linha-base para eventuais novos registros de ingredientes ativos que possam ser incorporados para controle de *Colletotrichum* spp. em caquizeiro e para futuros trabalhos de monitoramento da sensibilidade do fungo aos fungicidas. Este trabalho, também, forneceu testes de eficiência dos principais ingredientes ativos que estão registrados para controle de doenças na cultura, porém a maioria não estão recomendados para controle de *Colletotrichum* spp. Trata-se de um estudo pioneiro, que fornece novas informações a respeito desses produtos que estão disponíveis para os produtores.

A consideração final para o controle da antracnose do caquizeiro envolve: o manejo integrado desde a implantação do pomar, por meio da aquisição de mudas certificadas, e a correção do solo em pré-plantio; manejos após a implantação do pomar, por meio de condução, podas, tratamentos fitossanitários, adubações; e cuidados durante a colheita e em pós-colheita. Esses são os pontos-chave para minimizar os danos causados pelos patógenos investigados. Além disso, sempre que possível, seria indicada a renovação dos pomares mais antigos, evitando-se, assim a proliferação da doença.

Para redução do inóculo primário, proveniente dos ramos velhos, recomenda-se o tratamento de inverno, sendo realizadas, pelo menos, duas aplicações por safra. Durante o início do florescimento do caquizeiro, deve ser realizada a primeira pulverização, seguida de outras duas pulverizações durante a plena floração e no final da floração, e, posteriormente, no início da frutificação. Dessa forma, busca-se realizar o manejo preventivo, com o intuito de reduzir as infecções primárias e, conseqüentemente, evitar o inóculo secundário, que pode ser formado nos frutos em desenvolvimento, minimizando as infecções secundárias, que são as responsáveis por determinar a velocidade e/ou intensidade da epidemia na área.

Os resultados deste capítulo, tanto nos testes de fungitoxidade inerente (*in vitro* – CE₅₀), quanto nos ensaios de eficiência dos fungicidas, indicam, ainda, que os isolados de *Colletotrichum* spp. são sensíveis aos ingredientes ativos que estão registrados para o controle de doenças do caquizeiro, podendo ser utilizados no controle da antracnose. No entanto, deve-se atentar para não haver pressão de seleção de produtos com mesmo modo de ação sendo aplicados continuamente. Como visto neste capítulo, os ingredientes ativos dos IQe's revelaram alto risco de ocorrência de sensibilidade cruzada. O recomendado é realizar rotação dos produtos, intercalando diferentes ingredientes ativos com diferentes modos de ação, durante o ciclo de cultivo. Por exemplo, realizar aplicação preventiva, com fungicida de contato (multisítio); em seguida, com um produto de ação sistêmica (sítio específico); e, também, adotar produtos biológicos no manejo, para evitar o risco de seleção do fungo à resistência. Um número maior de aplicações pode ser necessário, dependendo do período de floração e das condições meteorológicas, pois maior precipitação favorece a disseminação do patógeno.

7 CONCLUSÕES

Isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de flores e ramos são sensíveis aos ingredientes ativos avaliados, exceto dois isolados de *C. fructicola*, que revelaram sensibilidade reduzida aos ingredientes ativos dos IQe's e IDM. Valores estimados de CE₅₀ para ingredientes ativos dos ISDH's, multisítios, e o ingrediente ativo ciprodinil podem servir como estudo linha-base para o caquizeiro.

Foi observado alto risco de sensibilidade cruzada de *Colletotrichum* spp. aos ingredientes ativos dos IQe's, enquanto, para os ISDH's, foi detectado baixo risco, sendo um potencial grupo químico para registro de controle de *Colletotrichum* spp., para a cultura do caquizeiro.

O fungicida à base de difenoconazol e os fungicidas com IQe e IDM (azoxistrobina + difenoconazol e trifloxistrobina + tebuconazol), na formulação, foram os mais eficazes para controle da antracnose do caquizeiro.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W. MITCHELL, D. J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, v.82, n.11, p.1377-1382, 1992.
- AGROFIT - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 21 maio 2020.
- AGUIAR, A. T. E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. et al. (Eds.). **Boletim 200**: instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. 7.ed. rev. e atual. Campinas: Instituto Agrônomo, 2014.
- ALVES, G.; VERBISKI, F. S.; MICHAILIDES, T. J.; MAY DE MIO, L. L. First report of *Pestalotiospsis diospyri* causing canker on persimmon trees. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.33, n.3, p.1019-1022, 2011.
- ALVES, R. F. **Etiologia da cercosporiose do caqui**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de "Agricultura Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2019.
- AMIRI, A.; HEATH, S. M.; PERES, N. A. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. **Plant Disease**, v. 98, n.4, p.532-539, 2014.
- ARAÚJO, K. S.; BRITO, V. N.; VELOSO, T. G. R.; LEITE, T. S.; PEREIRA, O. L.; MIZUBUTI, E. S. G.; QUEIROZ, M. V. Diversity of culturable endophytic fungi of *Hevea guianensis*: a latex producer native tree from the Brazilian Amazon. **African Journal of Microbiology Research**, v.12, n.4, p.953-962, 2018.
- ASANO, S.; HIRAYAMA, Y. Seasonal effect on infection with *Colletotrichum horii* causing anthracnose in persimmon twigs and the relation between its prevalence on twigs and occurrence in fruit. **Annual Report of The Kansai Plant Protection Society**, v.61, p.75-78, 2019.
- AVENOT, H. F.; MICHAILIDES, T. J. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. **Crop Protection**, v.78, p.214-221, 2015.
- BAGGIO, J. S.; WANG, N.-Y.; PERES, N. A.; AMORIM, L. Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole, and thiophanate-methyl. **Tropical Plant Pathology**, v.43, n.6, p.533-542, 2018
- BARONCELLI, R.; ZAPPARATA, A.; SARROCCO, S.; SUKNO, S. S.; LANE, C. R.; THON, M. R.; VANNACCI, G.; HOLUB, E.; SREENIVASAPRASAD, S. Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. **PLOS ONE**, v.10, n.6, p.e0129140, 2015.

BERNSTEIN, B.; ZEHR, E. I.; DEAN, R. A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, v.79, n.5, p.478- 482, 1995.

BIASI, L. A. **Cultura do caquizeiro**. 2017. Disponível em: <<https://pitangui.uepg.br/departamentos/defito/labiovegetal/Caqui.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

BLOOD, R. Y.; ROZWALKA, L. C.; MAY DE MIO, L. L. Antracnose do caquizeiro causada por *Colletotrichum horii*: incidência em ramos, folhas, flores e frutos em campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.37, n.2, p.333-345, 2015.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B, v.26, n.2, p.211-252, 1964.

BRACKMANN, A.; MAZARO, S. M.; SAQUET, A. A. Frigoconservação de caquis (*Diospyrus kaki* L.) das cultivares Fuyu e Rama Forte. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.27, n.4, p.561-566, 1997.

BRAGANÇA, C. A. D.; DAMM, U.; BARONCELLI, R.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; CROUS, P. W. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal Biology**, v.120, p.547-561, 2016.

BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2.ed. Brussel, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee, 2007.

BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L. W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v.86, n.5, p.523-527, 1996.

BUCHENAUER, H. Mechanism of action of triazoly fungicides and related compounds. In: LYR, H. (Ed.). **Modern selective fungicides**: properties, applications and mechanism of action. New York, US: Longman Scientific & Technical, 1987. p.205-231.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J. M.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v.39, p.183-204, 2009.

CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum**: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. St. Paul: APS Press, 2000. Chap. 1. p.10-13.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, v.73, n.1, p.181-213, 2012.

CANO, J.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.6, p.2450-2454, 2004.

CARRARO, T. A.; LICHTENBERG, P. S. F.; MICHAELIDES, T. J.; PEREIRA, W. V.; FIGUEIREDO, J. A. G.; MAY DE MIO, L. L. First Report of *Colletotrichum fructicola*, *C. nymphaeae* and *C. melonis* causing Persimmon Anthracnose in Brazil. **Plant Disease**, v.103, n.10, p.2692, 2019.

CHECHI, A.; STAHLCKER, J.; DOWLING, M. E.; SCHNABEL, G. Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.158, p.18-24, 2019.

CHEN, S. N.; LUO, C. X.; HU, M. J.; SCHNABEL, G. Sensitivity of *Colletotrichum* species, including *C. fiorinae* and *C. nymphaeae*, from peach to demethylation inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v.100, n.12, p.2434-2441, 2016.

CORDA, A. C. J. Deutschlands Flora, Abt. III. **Die Pilze Deutschlands**, v.3, n.12, p.33-64, 1831.

COX, K. D.; BRYSON, P. K.; SCHNABEL, G. Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, v.97, n.4, p.448-453, 2007.

COX, M. L.; IRWIN, A. G. Conidium and apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**, v.1, n.2, p.139-149, 1988.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, v.101, n.5, p.648-656, 2009.

DA SILVA, L. L.; MORENO, H. L. A.; CORREIA, H. L. N.; SANTANA, M. F.; DE QUEIROZ, M. V. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.104, n.5, p.1891-1904, 2020.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUTENBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, n.1, p.37-113, 2012.

DAMM, U.; SATO, T.; ALIZADEH, A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v.92, p.1-46, 2019.

DAMM, U.; WOUTENBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v.39, p.45-87, 2009.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v.9, n.8, p.772, 2012.

DE CISNE, C. V.; VELHO, A. C.; ROCKENBACH, M. F.; STADNIK, M. J. Variação morfocultural e agressividade de *Colletotrichum fructicola* em um pomar de macieira em Fraiburgo, SC. **Agropecuária Catarinense**, v.30, n.1, p. 66-72, 2017.

DE SILVA, D. D.; CROUS, P. W.; ADES, P. K.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J. Lifestyles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v.31, n.3, p.155-168, 2017.

DE WAARD, M. A.; ANDRADE, A. C.; HAYASHI, K.; SCHOONBEEK, H. J.; STERGIOPOULOS, I.; ZWIERS, L. H. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. **Pest Management Science**, v.62, n.3, p.195-207, 2006.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, n.4, p.414-430, 2012.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J. E.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version 1. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, n.4, p.19-21, 1983.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M. M. Resistência Genética à podridão amarga em maçãs, determinadas pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem ferimentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, p.494-497, 2003.

DENG, Q.; DING, X.; LI, J.; CUI, L.; XU, J. Morphological characteristics and genetic diversity of *Colletotrichum horii* infecting persimmon tree in China. **European Journal of Plant Pathology**, v.156, n.1, p.1-13, 2019.

DOLINSKI, M. A.; D'ANGELO, J. W. O.; CARRARO, T. A.; TOFANELLI, M. B.; MAY DE-MIO, L. L. **Queda de frutos ao longo do ciclo de caquizeiro**. Trabalho apresentado no XXIV Congresso Brasileiro de Fruticultura. São Luís, MA, 2016.

DOLINSKI, M. A.; GORAYEB, E. S.; MAY DE MIO, L. L. ***Colletotrichum horii* em caquizeiro**: sobrevivência nos ramos de ano e infecções em flores. Trabalho apresentado no XXXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia. Araras, SP, 2015.

DOWLING, M. E.; PERES, N. A.; VILLANI, S.; SCHNABEL, G. Managing *Colletotrichum* on Fruit Crops: A "Complex" Challenge. **Plant Disease**, 2020.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia**, v.97, n.3, p.641-658, 2005.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; CHEN, F.; SCHNABEL, G. Resistance to Cyprodinil and Lack of Fludioxonil Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry in North and South Carolina. **Plant Disease**, v.97, n.1, p.81-85, 2013.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; GRABKE, A.; BRYSON, P. K.; AMIRI, A.; PERES, N. A.; SCHNABEL, G. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern us states. **Plant Disease**, v.98, p.825-833, 2014.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; CHAMORRO, M.; DE LA PEÑA, E.; DE VICENTE, A.; TORÉS, J. A. Resistance to the SDHI fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain. **Plant Disease**, v.101, n.7, p.1306-1313, 2017.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORES, J. A.; DE VICENTE, A.; PEREZ-GARCIA, A. Mechanisms of resistance to Qol fungicides in phytopathogenic fungi. **International microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v.11, n.1, p.1-9, 2008.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J.; DE VICENTE, A.; PÉREZ-GARCÍA, A. The Qol fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: CARISSE, O. (Ed.) **Fungicides**. Rijeka, Croatia: InTech, 2010. p.203-220.

FERRI, A.; GIORDANI, E.; BENELLI, C. Viability and in vitro germination rate of pollen grains of *D. kaki* Thunb., *D. lotus* L. and *D. virginiana* L. in relation to storage time and temperatures. **Acta Horticulturae**, v.996, p.97-102, 2013.

FISHER, N.; BROWN, A. C.; SEXTON, G.; COOK, A.; WINDASS, J.; MEUNIER, B. Modeling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b. **European Journal of Biochemistry**, v.271, n.11, p.2264-2271, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). FAOSTAT, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 11 maio 2020.

FORCELINI, B. B.; SEIJO, T. E.; AMIRI, A.; PERES, N. A. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v.100, p.2050-2056, 2016.

FÖRSTER, H.; KANETIS, L.; ADASKAVEG, J. E. Spiral gradient dilution, a rapid method for determining growth responses and 50% effective concentration values in fungus-fungicide interactions. **Phytopathology**, v.94, n.2, p.163-170, 2004.

FRAC. **FRAC Code List 2019**: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering). CropLife International, Brussels, Belgium, 2019.

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. **FRAC Code List ©*2020**: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-final5d632b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=f940499a_2>. Acesso em: 21 maio 2020.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v.82, n.6, p.596-605, 1998.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular Analyses of *Colletotrichum* Species from Almond and Other Fruits. **Phytopathology**, v.90, n.6, p.608-614, 2000.

GAMA, A. B.; BAGGIO, J. S.; REBELLO, C. S.; LOURENÇO, S. A.; GASPAROTO, M. C.; da SILVA JÚNIOR, G. J.; PERES, N. A.; AMORIM, L. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from citrus to carbendazim, difenoconazole, tebuconazole, and trifloxystrobin. **Plant Disease**, v.104, n.6, p.1621-1628, 2020.

GANG, G-H.; CHO, H. J.; KIM, H. S.; KWACK, Y-B.; KWACK, Y-S. Analysis of Fungicide Sensitivity and Genetic Diversity among *Colletotrichum* Species in Sweet Persimmon. **Plant Pathology Journal**, v.31, n.2, p.115-122, 2015.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, n.2, p.113-118, 1993.

GASPAROTO, M. C. G.; LOURENÇA, S. A.; TANAKA, F. A. O; SPÓSITO, M. B.; MARCHINI, L. C.; SILVA JÚNIOR, G. J.; AMORIM, L. Honeybees can spread *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* among citrus plants. **Plant Pathology**, v.66, n.5, p.777-782, 2017.

GAUTAM, A. K. *Colletotrichum gloeosporioides*: biology, pathogenicity, and management in India. **Journal of Plant Physiology Pathology**, v.2, n.2, 2014.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GIN RAZZOUK, P. L. **Avaliação fenológica de dez cultivares de caquizeiro *Diospyros kaki* L. e propagação por estaquia em regiões tropicais**. 104f. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção) - Campus de Ilha Solteira, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2007.

GISI, U.; MÜLLER, U.; HALL, S. Fungicides Acting on Amino Acids and Protein Synthesis. In: JESCHKE, P.; WITSCHKE, M.; KRÄMER, W.; SCHIRMER, U. (Eds.). **Anilinopyrimidines: Methionine Biosynthesis Inhibitors**. Modern Crop Protection Compounds. 3.ed. Berlin: Verlag, 2019. p.749-759.

GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MACCAFFERY, A. Baseline sensitivity of *Monilia yunnanensis* to the DMI fungicides tebuconazole and triadimefon. **European Journal of Plant Pathology**, v.136, n.4, p.651-655, 2002.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1323-1330, 1995.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, v.23, n.1, p.4-10, 1997.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B.; COREELL, J. C. Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests. **Phytopathology**, v.96, p.982-992, 2006.

GUGINSKI-PIVA, C. A.; BOGO, A.; GOMES, B. R.; MENON, J. K.; NODARI, R. O.; AND WELTER, L. J. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphaeae* and *C. fructicola* associated with anthracnose symptoms of grape in Santa Catarina State, southern Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.125, p.405-413, 2018.

GUNNEL, P. S.; GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, v.84, n.2, p.157-165, 1992.

HASSAN, O.; JEON, J. Y.; CHANG, T.; SHIN, J. S.; OH, N. K.; LEE, Y. S. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. **Plant Disease**, v.102, n.5, p.1015-1024, 2018.

HASSAN, O.; LEE, D. W.; CHANG, T. First Report of Anthracnose of Persimmon Caused by *Colletotrichum nymphaeae* in Korea. **Plant Disease**, v.103, n.7, p.1772, 2019.

HOLB, I. J.; SCHNABEL, G. Differential effect of triazoles on mycelial growth and disease measurements of *Monilinia fructicola* isolates with reduced sensitivity to DMI fungicides. **Crop Protection**, v.26, p.753-759, 2007.

HORI, S. Kaki no Shinbyogai Tansobyō. **Engel no Tomo**, v.6, n.1, p.58-61, 1910.

HU, M.-J.; FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; SCHNABEL, G. Monitoring resistance to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea* from strawberry fields. **Plant Disease**, v.100, p.959-965, 2016.

HU, M.-J.; GRABKE, A.; DOWLING, M. E.; HOLSTEIN, H. J.; SHNABEL, G. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. **Plant Disease**, v.99, p.806-814, 2015.

HU, M.-J.; GRABKE, A.; SCHNABEL, G. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing peach anthracnose in South Carolina. **Plant Disease**, v.99, n.6, p.797-805, 2015.

HU, M.-J.; LUO, C.-X.; GRABKE, A.; SCHNABEL, G. Selection of a suitable medium to determine sensitivity of *Monilinia fructicola* mycelium to SDHI fungicides. **Journal of Phytopathology**, v.159, n.9, p.616-620, 2011.

HUANG, F.; CHEN, G. Q.; HOU, X.; FU, Y. S.; CAI, L.; HYDE, K. D.; LI, H. Y. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. **Fungal Diversity**, v.61, n.1, p.61-74, 2013.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v.39, p.147-182, 2009.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v.39, p.1-17, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Quantidade produzida (toneladas) de caqui.** 2018. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 11 maio 2020.

ISHII, H.; MIYAMOTO, T.; USHIO, S.; KAKISHIMAB, M. Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. **Pest Management Science**, v.67, p.474-482, 2010.

ISHII, H.; ZHEN, F.; HU, M. J.; LI, X. P.; SCHNABEL, G. Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species. **Pest Management Science**, v.72, n.10, p.1844-1853, 2016.

ITO, S. Gloeosporiose of the Japanese persimmon. **The Botanical Magazine** (Tokyo), v.25, n.296, p.197-202, 1911.

JAYAWARDENA, R. S.; HUANG, J. K.; JIN, B. C.; YAN, J. Y.; LI, X. H.; HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; YIN, S. L.; ZHANG, G. Z. An account of *Colletotrichum* species associated with strawberry anthracnose in China based on morphology and molecular data. **Mycosphere**, v.7, n.8, p.1147-1163, 2016.

JINGJING, J.; HONGYAN, Z.; HUANNAN, L.; ZHENHUA, W.; YONGSEN, C.; NI, H.; GUOPING, W.; GILBERT, N.; WENZING, X. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. **Crop Protection**, v.58, p.41-48, 2014.

JOHNSON, K. A. **Characterization and fungicide efficacy of North Carolina *Colletotrichum* populations causing glomerella leaf spot and fruit rot on apple.** 2018. Disponível em: <<https://repository.lib.ncsu.edu/bitstream/handle/1840.20/36308/etd.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 12 jun. 2020.

KAMEI, S. H.; COSTA, J. F. O.; NETTO, M. S. B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, ed. esp. 1, p.209-216, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000500025&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 jun. 2020.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, v.53, p.457-481, 1958.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S. E.; DICKMAN, M. B. ***Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen Interaction.** St. Paul: APS Press, 2000. Cap. 4. p.45-56.

KELLY, S. L.; KELLY, D. E. Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us? **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences**, v.368, n.1612, 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p.1870-1874, 2016.

KWON, J. H.; KIM, J. First report of fruit black spot of *Diospyros kaki* caused by *Colletotrichum acutatum* in Korea. **J. Plant Pathol.**, v.27, p.100-100, 2011.

KWON, J. H.; KIM, J.; CHOI, O.; GANG, G. H.; HAN, S.; KWAK, Y. S. Anthracnose caused by *Colletotrichum horii* on sweet persimmon in Korea: dissemination of conidia and disease development. **Journal of Phytopathology**, v.161, n.7-8, p.497-502, 2013.

KWON, J. H.; PARK, C. S. Dissemination of conidiospores of *Colletotrichum gloeosporioides*, the anthracnose of persimmon and the disease development. **Research in Plant Disease**, v.10, p.272-278, 2004.

LAKSHMI, B. K. M.; REDDY, P. N.; PRASAD, R. D. Cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates causing anthracnose in subtropical fruit crops. **Tropical Agricultural Research**, v.22, p.183-193, 2011.

LEADBEATER, A. Resistance risk to QoI fungicides and anti-resistance strategies. In: THIND, T. S. (Ed.). **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Oxfordshire: CABI International, 2012. p.141-154.

LEROCH, M.; PLESKEN, C.; WEBER, R. W. S.; KAUFF, F.; SCALLIET, G.; HAHN, M. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.159-167, 2013.

LEROUX, P.; GREDET, M.; REMUSON, F.; MICOUD, A.; WALKER, A.-S. Fungicide resistance status in French populations of the wheat eyespot fungi *Oculimacula acuformis* and *Oculimacula yallundae*. **Pest Management Science**, v.69, n.1, p.15-26, 2012.

LIAO, C. Y.; CHEN, M. Y.; CHEN, Y. K.; WANG, T. C.; SHEU, Z. M.; KUO, K. C.; CHANG, P. F. L.; CHUNG, K. R.; LEE, M. H. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, n.3, p.599-608, 2012.

LICHTENBERG, P. S. F.; GUSELLA, G.; DOUSSOULIN, H.; CARRARO, T.; FELTS, D. G.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of eight fungicide chemical groups for *Colletotrichum fioriniae*, the cause of anthracnose of pistachio in California. (Abstract) **Phytopathology**, v.108, p.S1.155, 2018.

LICHTENBERG, P. S. F.; PRIMIANO, I. V.; FISCHER, J. M.; GLIENKE, C.; AMORIM, L.; MAY DE MIO, L. L. Resistência de *Monilinia* spp. aos fungicidas do grupo Inibidores da Desmetilação (IDM), Inibidores da Quinona Externa (IQe) e dos Metilo Benzimidazol Carbamatos (MBC). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.24, p.145-173, 2016.

LICTHEMBERG, P. S. F.; MARZALL-PEREIRA, M.; BROSIN, J.; CARRARO, T.; PUCKETT, R.; MICHAILIDES, T. J. An alternative succinate dehydrogenase inhibitor to control the pistachio anthracnose caused by *Colletotrichum fioriniae* in California. **APS Annual Meeting** (Pôster), 2020.

LIM, T.-H.; CHOI, Y.-H. Response of several fungicides of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates obtained from persimmons in Sangju. **Korean Journal of Plant Pathology**, v.12, n.2, p.99-102, 2006.

LIM, T. -H.; CHOI, Y. -H.; LEE, D. -W.; HAN, S. -S; CHA, B. -J. Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from pesimmon to benzimidazoles, mancozeb and propinep. **Korean Journal of Pesticide Science**, v.13, p.105-110, 2009.

LIMA, N. B.; LIMA, W. G.; TOVAR-PEDRAZA, J. M.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, p.649-688, 2015.

LIMA, N. B.; MARCUS, M. V.; DE MORAIS, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D.; CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, n.1, p.75-88, 2013.

LIU, F.; WANG, M.; DAMM, U.; CROUS, P. W.; CAI L. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. **BMC Evolutionary Biology**, v.16, n.1, p.81, 2016.

LOPES, P. R. C.; OLIVEIRA, I. V. M.; DE OLIVEIRA, J. E. M.; DE ASSIS, J. S. **Cultivo do caquizeiro no Vale do São Francisco**. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido 2014. (Circular técnica n. 107).

LOPES, L. N. S.; SILVA, A. S.; PEREIRA, C. C. O.; MENEZES, I. P. P.; MALAFAIA, G.; LIMA, M. L. P. Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Multi-Science Journal**, v.1, n.1, p.106-114, 2015.

LOPEZ-MORAL, A.; RAYA-ORTEGA, M. C.; AGUSTI-BRISACH, C.; ROCA, L.F. Morphological, Pathogenic, and Molecular Characterization of *Colletotrichum acutatum* Isolates Causing Almond Anthracnose in Spain. **Plant Disease**, v.101, n.12, p.2034-2045, 2017.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; TACCA, M. D.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p.76-81, 2002.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v.24, n.10, p.853-863, 2005.

MACKENZIE, S. J.; PERES, N. A.; BARQUERO, M. P.; ARAUZ, L. F.; TIMMER, L. W. Host range and genetic relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops an leatherleaf fern in Florida. **Phytopathology**, v.99, p.620-631, 2009.

MAFFEI, L. Una malattia delle foglie del "Kaki" dovuta al *Colletotrichum kaki* n. sp. **Rivista di Patologia Vegetale**, v.11, n.9-10, p.116-118, 1921.

MALANDRAKIS, A. A.; APOSTOLIDOU, A. A.; MARKOGLU, A.; FLOURI, F. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. **European Journal of Plant Pathology**, v.142, n.3, p.489-499, 2015.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, v.79, n.4, p.380-383, 1995.

MANAMGODA, D. S.; UDAYANGA, D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**, v.61, n.1, p.107-115, 2013.

MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J. Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, v.86, p.99-216, 2017.

MARTINS, F. P.; PEREIRA, F. M. **Cultura do caqui**. Jaboticabal: FUNEP, 1989.

MATHEUS, J. R. V.; DE ANDRADE, C. J.; MIYAHIRA, R. F.; FAI, A. E. C. Persimmon (*Diospyros kaki* L.): Chemical Properties, Bioactive Compounds and Potential Use in the Development of New Products - A Review. **Food Reviews International**, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2020.1733597>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

MATOS, C. S. Cultivares de caqui (*Diospyros kaki*) em Santa Catarina. In: ENFRUTE, 2., 1999, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: EPAGRI. 1999. p.64-69.

MAY DE MIO, L. L.; SILVA, F. A.; BLOOD, R. Y.; FIGUEIREDO, J. A. G. Twig blight and defoliation caused by *Colletotrichum horii* in persimmons in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, n.1, p.258-262, 2015.

MAY DE MIO, L. L.; DOLINSKI, M. A.; BLOOD, R. Y.; CARRARO, T. A. Manejo da antracnose do caqui. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 16., 2019, Fraiburgo, SC. **Anais...** Caçador: Epagri, (palestras), 2019. v.1. p.32-36.

MERTELY, J. C.; LEGARD, D. E. Detection, Isolation, and Pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from Strawberry Petioles. **Plant Disease**, v.88, n.4, p.407-412, 2004.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.98, n.1-3, p.137-144, 1992.

MOREIRA, R. R.; HAMADA, N. A.; PERES, A.; MAY DE MIO, L. L. Sensitivity of the *Colletotrichum acutatum* species complex from apple trees in Brazil to dithiocarbamates, methyl benzimidazole carbamates, and a quinone outside inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v.103, n.10, p.2569-2576, 2019a.

MOREIRA, R. R.; PERES, N. A.; MAY DE MIO, L. L. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* Species Associated with Apple in Brazil. **Plant Disease**, v.103, p.268-275, 2019.

MOREIRA, R. R.; SILVA, G. A.; MAY DE MIO, L. L. *Colletotrichum acutatum* complex causing anthracnose on peach in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v.49, n.2, p.179-189, 2020.

MOREIRA, R. R.; VANDRESEN, D. P.; GLIENKE, C.; MAY DE MIO L. L. First Report of *Colletotrichum nymphaeae* causing blossom blight, peduncle and fruit rot on *Pyrus pyrifolia* in Brazil. **Plant Disease**, v.103, n.8, p.2133, 2019b.

MUNIR, M.; AMSDEN, B.; DIXON, E.; VAILLANCOURT, L.; GAUTHIER, N. A. W. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. **Plant Disease**, v.100, p.2194-2203, 2016.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERING, J. T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment. **Journal of Molecular Biology**, v.302, n.1, p.205-217, 2000.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v.27, n.1, p.75-98, 1985.

O'CONNELL, R.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection process. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. **Colletotrichum**: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction. St. Paul-Minnesota: APS Press, 2000. p.57-77.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7, n.1, p.103-116, 1997.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, M. S.; CORDOVA, L. G.; PERES, N. A. Efficacy and baseline sensitivity of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicides for management of *Colletotrichum* crown rot of strawberry. **Plant Disease**, 2020.

OLIVER, R. P.; HEWITT, H. G. **Fungicides in crop protection**. 2.ed. Oxfordshire, UK: CABI International, 2014.

PALOU, L.; MONTESINOS-HERRERO, C.; TARAZONA, I.; BESADA, C.; TABERNER, V. Incidence and etiology of postharvest fungal diseases of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante) in Spain. **Plant Disease**, v.99, n.10, p.1416-1425, 2015.

PENG, L. J.; SUN, T.; YANG, Y. L.; CAI, L.; HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; LIU, Z. Y. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Mycoscience**, v.54, n.1, p.29-41, 2013.

PENTEADO, S. **Fruticultura de clima temperado em São Paulo**. Campinas: Fundação Cargill, 1986.

PEREIRA, W. V.; PADILHA, A. C. N.; KAISER, J. A. O.; NESI, C. N.; FISHCER, J. M. M.; MAY DE MIO, L. L. *Monilinia* spp. from imported stone fruits may represent a risk to Brazilian fruit production. **Tropical Plant Pathology**, v.44, n.2, p.120-131, 2019.

PEREIRA, W. V.; PRIMIANO, I. V.; MORALES, R. G. F.; PERES, N. A.; AMORIM, L.; MAY DE MIO, L. L. Reduced sensitivity to azoxystrobin of *Monilinia fructicola* isolates from Brazilian stone fruits is not associated with previously described mutation in the cytochrome *b* gene. **Plant Disease**, v.101, n.5, p.766-773, 2017.

PERES, N. A.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; DE SOUZA, N. L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.150, p.128-134, 2002.

PERES, N. A.; TIMMER, L. W.; ADASKAVEG, J. E.; CORRELL, J. C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v.89, n.8, p.784-796, 2005.

PHOULIVONG, S.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v.2, n.2, p.99-111, 2012.

PIO, R. **A cultura do caquizeiro**. Piracicaba, SP: DIBID, ESALQ/USP, 2003. (Série Produtor Rural, n.22).

PLOETZ, R. C. Diseases of Tropical Perennial Crops: Challenging Problems in Diverse Environments. **Plant Disease**, v.91, n.6, p.644-663, 2007.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, v.39, n.1, p.89-109, 2009.

QUIRÓS, M. B.; PERES, N. A.; ARAU, L. F. Presencia de *Colletotrichum acutatum* Y *Colletotrichum gloeosporioides* em helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango em Costa Rica y Florida (Estados Unidos). **Agronomía Costarricense**, v.37, n.1, p.23-38, 2013.

RAGAZZINI, D. **El kaki**. Madrid: Mundiprensa, 1985.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas**: guia para controle químico de doenças de plantas. 6.ed. Passo Fundo, Brasil: UPF, 2010.

ROCKENBACH, M. F.; VELHO, A. C.; GONÇALVES, A. E.; MONDINO, P. E.; ALANIZ, S. M.; STADNIK, M. J. Genetic structure of *Colletotrichum fructicola* associated to apple bitter rot and Glomerella leaf spot in southern Brazil and Uruguay. **Phytopathology**, v.106, n.7, p.774-781, 2016.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** v.19, n.12, p.1572-1574, 2003.

RUSSELL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management**. Cambridge, UK: Crop Life International, 2004.

SATO, T.; MORIWAKI, J.; MISAWA, T. Molecular re-identification of strains of the *Colletotrichum acutatum* species complex deposited in the NIAS Genebank and morphological characteristics of its member species. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.47, n.3, p.295-305, 2013.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, p.213-267, 2011.

SCHNABEL, G.; BRYSON, P. K.; BRIDGES, W. C.; BRANNEN, P. M. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole in Georgia and implications for disease management. **Plant Disease**, v.88, n.9, p.1000-1004, 2004.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. 3.ed. Ribeirão Preto: Holos, 2007.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n.16, p.6241-6246, 2012.

SEMAR, M.; STROBEL, D.; KOCH, A.; KLAPPACH, K.; STAMMLER, G. Baseline sensitivity of *Monilia yunnanensis* to the DMI fungicides tebuconazole and triadimefon. **European Journal of Plant Pathology**, v.136, n.4, p.651-655, 2007.

SHARMA, G.; KUMAR, N.; WEIR, B. S.; HYDE, K. D.; SHENOY, B. D. The *ApMat* marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Magnifera indica*. **Fungal Diversity**, v.61, p.117-138, 2013.

SHARMA, G.; SHENOY, B. D. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.47, n.10, p.1179-1194, 2014.

SHIVAPRAKASH, M. R.; APPANNANAVAR, S. B.; DHALIWAL, M.; GUPTA, A.; GUPTA, S.; GUPTA, A.; CHAKRABARTI, A. *Colletotrichum truncatum*: an unusual pathogen causing mycotic keratitis and endophthalmitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.8, p.2894-2898, 2011.

SIEROTZKI, H. Respiration Inhibitors: Complex III. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens: Principles and a guide to practical management**. Japan: Springer, 2015. p.119-143.

SIEROTZKI, H.; FREY, R.; MORCHOISNE, M.; OLAYA, G.; MOSCH, M.; SCALLIET, G. Sensitivity of fungal pathogens to SDHI fungicides. In: DEHNE, H. W.; DEISING, H. B.; GISI, U.; KUCK, K. H.; RUSSELL, P. E.; LYR, H. (Eds.). **Modern Fungicides and Antifungal Compounds**. DPG, Braunschweig, Germany, 2011. v.6. p.179-186.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. **Phytopathology**, v.103, n.9, p.880-887, 2013.

SIEROTZKI, H.; WULLSCHLEGER, J.; PALERMO, S.; KARLIN, D.; GOWIN, J.; GISI, U. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. **Pest Management Science**, v.63, p.225-233, 2007.

SILVA, A. O.; SAVI, D. C.; GOMES, F. B.; GOS, F. M. W. R.; SILVA-JUNIOR, G. J.; GLIENKE, C. Identification of *Colletotrichum* species associated with postbloom fruit drop in Brazil through GAPDH sequencing analysis and multiplex PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.147, n.4, p.731-748, 2017.

SIMMONDS, J. H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Science**, Brisbane, v.22, n.4, p.437-459, 1965.

SINCLAIR, J. B.; DHINGRA, O. D. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, v.45, n.4, p.650-655, 1996.

STAMMLER, G.; SPEAKMAN, J. Microtiter Method to Test the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. **Journal of Phytopathology**, v.154, n.7-8, p.508-510, 2006.

STAMMLER, G.; WOLF, A.; GLAETTLI, A.; KLAPPACH, K. Respiration INHIBITORS: Complex II. In: ISHII, H; HOLLOMON, D. (Eds.). **Fungicide Resistance in Plant Pathology**. Tokyo: Springer, 2015. p.105-18.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Bioestatística**. 2.ed. Bogota, Colombia: McGraw-Hill, 1985.

SUTTON, B. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, UK: CABI, 1992. p.1-26.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980.

TALHINHAS, P.; GONÇALVES, E.; SREENIVASAPRASAD, S.; OLIVEIRA, H. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, v.142, p.73-83, 2015.

TEMPLETON, M. D.; RIKKERINK E. H. A.; SOLON S. L.; CROWHURST R. N. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, v.122, n.1, p.225-230, 1992.

THERNEAU, T. **A Package for Survival Analysis in S**. R package version 3.4.0. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=survival>>. Acessado em: 15 jun. 2020.

THINES, E.; WEBER, R.W.S.; TALBOT, N. MAP Kinase and protein kinase a-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**, v.12, p.1703-1718, 2000.

TIMMER, L. W.; AGOSTINI, J. P.; ZITKO, S. E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, a increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, v.78, n.4, p.329-334, 1994.

TÖFOLI, J. G.; DE MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Controle da requeima e pinta preta da batata por fungicidas e seu reflexo sobre a produtividade e a qualidade de tubérculos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p.1-12, 2015.

TORRES-LONDOÑO, G. A.; HAUSBECK, M.; HAO, J. ECX: An R Package for Studying Sensitivity of Antimicrobial Substances Using Spiral Plating Technology. **Plant Healthy Progress**, v.17, n.4, p.188-194, 2016.

TOZZE-JÚNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 81p. Dissertação (Mestrado), Fitopatologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, 2007.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.41, n.4, p.270-280, 2015.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.1, p.71-79, 2006.

UREÑA-PADILLA, A. R.; MACKENZIE, S. J.; BOWEN, B. W.; LEGARD, D. E. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. **Phytopathology**, v.92, p.1245-1252, 2002.

VALERO, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, S.; GINER, M.; ALONSO, A.; RUIZ, J. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. **European journal of Plant Pathology**, v.127, n.3, p.399-405, 2010.

VAN DER AA, H. A. A leaf spot disease of *Nymphaea alba* in the Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.84, p.109-115, 1978.

VELHO, A. C.; ALANIZ, S.; CASANOVA, L.; MONDINO, P.; STADNICK, M. J. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, v.119, n.4, p.229-244, 2015.

VIEIRA, W. A. S.; BEZERRA, P. A.; DA SILVA, A. C.; SILVA VELOSO, J.; PAZ SARAIVA CÂMARA, M.; PATRICK DOYLE, V. Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.143, p.106694, 2020.

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases**. Uppsala: Faculty of Science and Technology, 2004. 72 p. Disponível em: <www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902_fulltext.pdf>. Acesso em: 14 maio 2020.

VON ARX, J. A. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten pilze. **Revision der zu Gloeosporium gestellten Pilze. Verhandelingen Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Afdeling Natuurkunde**, v.51, n.3, p.1-153, 1957.

WACULICZ-ANDRADE, C. E. **Isolamento, identificação e sensibilidade a fungicidas de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas de pomares cítricos**. 71f. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/40382>>. Acesso em: 03 jun. 2020.

WANG, J.; AI, C. X.; YU, X. M.; AN, M.; SUN, S.; GAO, R. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on persimmon leaves in China. **Plant Disease**, v.100, n.2, p.532, 2016.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R. Characterisation and epitypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii* nom. nov. **Mycotaxon**, v.111, p.209-219, 2010.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, n.1, p.115-180, 2012.

WHARTON, P. S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v.61, n.1, p.3-22, 2004.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M.; O' CONNELL, R. J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineoum*. **Phytopathology**, v.91, n.2, p.149-157, 2001.

WHITE, T. M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-321.

WILEY, E. O. **Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics**. New Jersey: John Wiley & Sons, 1981.

WILLIAMSON, S. M.; SUTTON, T. B. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on persimmon fruit in the United States. **Plant Disease**, v.94, n.5, p.634, 2010.

WOLOSHUK, C. P.; SISLER, H. D. Tricyclazole, Pyroquilon, Tetrachlorophthalide, PCBA, Coumarin and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**, v.7, p.161-166, 1982.

XIE, L.; ZHANG, J.; CAI, L.; HYDE, D. Biology of *Colletotrichum horii*, the causal agent of persimmon anthracnose. **Mycology**, v.1, n.4, p.242-253, 2010.

YAMAMURA, H.; NAITO, R.; MOCHIDA, K. Mechanism of the thinning action of NAA in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) fruits. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.45, p.1-6, 1976.

YOKOSAWA, S.; EGUCHI, N.; KONDO, K.; SATO, T. Phylogenetic relationship and fungicide sensitivity of members of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex from apple. **Journal of General Plant Pathology**, v.83, n.5, p.291-298, 2017.

YUAN, N.-N.; CHEN, S.-N.; ZHAI, L.-X.; SCHNABEL, G.; YIN, L.-F.; LUO, C.-X. Baseline sensitivity of *Monilia yunnanensis* to the DMI fungicides tebuconazole and triadimefon. **European Journal of Plant Pathology**, v.136, n.4, p.651-655, 2013.

YU, X.; HOU, C.; ZHANG, K.; ZHAI, H.; MA, Y.; NA, M.; AI, C. Inhibitory Effect of 16 Fungicides on persimmon Anthracnose Pathogen *Colletotrichum horii*. **Agricultural Biotechnology**, v.8, n.1, p.31-33, 2019.

ZHANG, J. Z. Anthracnose of persimmon caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China. **Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v.2, n.2, p.50-54, 2008.

ZHANG, X.; BATZER, J. C.; LI, X.; PERES, N. A.; GLEASON, M. L. Validation of a Florida strawberry anthracnose fruit rot (AFR) warning system in Iowa. **Plant Disease**, v.103, p.28-33, 2019.

ZHANG, J. -Z.; HU, D. -W. Effects of environment factors on conidia germination, appressorium formation and pathogenicity of the persimmon anthracnose pathogens *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.22, n.4, p.645-652, 2004.

ZHANG, J. -Z.; XU, T.; HE, L. -P. Anthracnose pathogen on *Diospyros kaki* cv Wuheshi and its nuclear behavior in process of appressorium formation. **Mycosystema**, v.24, n.3, p.446-456, 2005.

ZHANG, J. Z.; HU, D. W.; XU T. Ultrastructure of infection of persimmon petiole by *Collectotrichum gloeosporioides*. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.35, n.5, p.434-441, 2005.

ZHANG, J. Z.; XU, T. Studies on various stages and amount of anthracnose of persimmon on twigs after overwintering. **Journal of Plant Protection**, v.30, n.4, p.437-438, 2003.

ZHANG, J. Z.; XU, T. Cytological characteristics of the infection in different species, varieties and organs of persimmon by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycosystema**, v.24, n.1, p.116-122, 2005.

ZHANG, Z. Parametric regression model for survival data: Weibull regression model as an example. **Annals of Translational Medicine**, v.4, n.24, p.484, 2016.

ZUNIGA, A. I.; OLIVEIRA, M. S.; SUGUINOSHITA REBELLO, C.; PERES, N. A. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry to isofetamid compared to other SDHIs. **Plant Disease**, v.104, n.4, p.1224-1230, 2019.

APÊNDICE

TESTE DE IGUALDADE DA ANÁLISE DO EFEITO DE TEMPERATURA ÓTIMA

Tabela com o resultado para os testes de hipótese de igualdade entre os vetores de parâmetros das curvas entre pares de isolados, A e B, dentro de cada espécie. A estatística F corresponde ao teste sobre a mudança na soma de quadrados, provocada pela combinação de dois isolados, passando de 13 para 12 níveis. Como o modelo utilizado é o polinômio de 3.º grau, ao testar que dois isolados possuem a mesma forma da curva, reduz-se 3 parâmetros do modelo livre (NumDF). Tabela ordenada pela espécie, seguida de valor-P (P-value).

TABELA 1 - TEMPERATURA ÓTIMA PARA CRESCIMENTO MICELIAL

ESPÉCIES	A	B	NumDF	DenDF	RSS	DiffRSS	F	p-value
<i>C. fructicola</i>	SP18-2	SP18-5	3	141	52,205	3,8790421	3,4922768	0,0174018
<i>C. fructicola</i>	SP18-2	SP18-3	3	141	52,205	2,8643835	2,5787862	0,0560846
<i>C. fructicola</i>	SP18-3	SP18-6	3	141	52,205	2,3018175	2,0723116	0,1066022
<i>C. fructicola</i>	SP18-5	SP18-6	3	141	52,205	2,0510981	1,8465905	0,1414852
<i>C. fructicola</i>	SP18-2	SP18-6	3	141	52,205	0,7804784	0,7026597	0,5519601
<i>C. fructicola</i>	SP18-3	SP18-5	3	141	52,205	0,558345	0,502683	0,6810383
<i>C. horii</i>	PR18-10	SP18-1	3	141	52,205	2,2543721	2,0295968	0,1124896
<i>C. horii</i>	PR18-8	SP18-1	3	141	52,205	1,265702	1,1395034	0,3353592
<i>C. horii</i>	PR18-6	SP18-1	3	141	52,205	1,08555	0,9773137	0,4053745
<i>C. horii</i>	PR18-6	PR18-8	3	141	52,205	0,8627276	0,7767082	0,508845
<i>C. horii</i>	PR18-10	PR18-8	3	141	52,205	0,7960528	0,7166812	0,5435926
<i>C. horii</i>	PR18-10	PR18-6	3	141	52,205	0,5563671	0,5008937	0,6822679
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-2	PR18-4	3	141	52,205	0,7028507	0,632772	0,5950561
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-1	PR18-2	3	141	52,205	0,54990107	0,4950729	0,6862758
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-1	PR18-7	3	141	52,205	0,4990301	0,4492736	0,7182025
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-2	PR18-7	3	141	52,205	0,4459317	0,4014694	0,7521576
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-4	PR18-7	3	141	52,205	0,2825053	0,254337	0,8581413
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-1	PR18-4	3	141	52,205	0,1103178	0,0993184	0,9602741

FONTE: O autor (2020).

TABELA 2 - TEMPERATURA ÓTIMA PARA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS

ESPÉCIES	A	B	NumDF	DenDF	RSS	DiffRSS	F	p-value
<i>C. fruticola</i>	SP18-2	SP18-3	3	337	0,5094	0,0062833	1,3855898	0,2469986
<i>C. fruticola</i>	SP18-3	SP18-5	3	337	0,5094	0,0058857	1,2979076	0,275041
<i>C. fruticola</i>	SP18-5	SP18-6	3	337	0,5094	0,0046167	1,0180594	0,3847506
<i>C. fruticola</i>	SP18-2	SP18-6	3	337	0,5094	0,0024857	0,5481454	0,6497095
<i>C. fruticola</i>	SP18-3	SP18-6	3	337	0,5094	0,0024357	0,5371195	0,6571472
<i>C. fruticola</i>	SP18-2	SP18-5	3	337	0,5094	0,002169	0,4783146	0,6975803
<i>C. horii</i>	PR18-6	SP18-1	3	337	0,5094	0,0340167	7,5012966	0,0000712
<i>C. horii</i>	PR18-6	PR18-8	3	337	0,5094	0,0250929	5,5334335	0,0010181
<i>C. horii</i>	PR18-10	SP18-1	3	337	0,5094	0,023419	5,164328	0,0016772
<i>C. horii</i>	PR18-10	PR18-8	3	337	0,5094	0,016019	3,5324927	0,0151061
<i>C. horii</i>	PR18-10	PR18-6	3	337	0,5094	0,0119024	2,6246925	0,0504438
<i>C. horii</i>	PR18-8	SP18-1	3	337	0,5094	0,0031429	0,6930574	0,556813
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-4	PR18-7	3	337	0,5094	0,02515	5,5460346	0,0010009
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-1	PR18-7	3	337	0,5094	0,0204857	4,514743	0,0040183
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-2	PR18-7	3	337	0,5094	0,0204548	4,5106488	0,0040555
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-1	PR18-4	3	337	0,5094	0,009369	2,0660462	0,1044942
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-2	PR18-4	3	337	0,5094	0,0089714	1,9783639	0,1169774
<i>C. nymphaeae</i>	PR18-1	PR18-2	3	337	0,5094	0,0008548	0,1884906	0,9042071

FONTE: O autor (2020).